

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Efectos de la colchicina sobre la placa aterosclerótica:
estudio en un modelo de aterosclerosis en conejo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Cecconi

DIRECTORES

Borja Ibáñez Cabeza
Carlos Macaya Miguel

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**EFFECTOS DE LA COLCHICINA SOBRE LA PLACA
ATEROSCLERÓTICA: ESTUDIO EN UN MODELO DE
ATEROSCLEROSIS EN CONEJO.**

Alberto Cecconi

Directores:
Borja Ibáñez Cabeza
Carlos Macaya Miguel

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**EFFECTOS DE LA COLCHICINA SOBRE LA PLACA
ATEROSCLERÓTICA: ESTUDIO EN UN MODELO DE
ATEROSCLEROSIS EN CONEJO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Alberto Cecconi

Directores:
Borja Ibáñez Cabeza
Carlos Macaya Miguel

Ai miei genitori

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Borja Ibáñez, por alimentar la ilusión con la que nació este proyecto y guiarme a lo largo del recorrido.

Al Dr. Carlos Macaya, por su apoyo y haber confiado en el proyecto.

A Jesús Mateo, pilar fundamental del proyecto, por su constante apoyo intelectual y humano.

A Jean Paul Vilchez, por haber compartido las ilusiones y las dificultades de este proyecto.

A Beatriz López, por su apoyo constante al proyecto.

A Rodrigo Fernandez, por su disponibilidad incondicional y por ser un ejemplo a seguir.

A Joern y Angel, por no dejar que se me pierda el norte en las prioridades de la vida.

A mis residentes, por regar la ilusión para la investigación y a Javier Higuera, por reconocer el valor de un almendro.

A María, por acompañarme en éste como en los demás viajes de la vida, compartiendo la carga y la ilusión de cada etapa.

A mio fratello, Maurizio, per aver sempre creduto in me.

Ai miei genitori, Nicola e Daniela, per avermi sempre offerto il meglio. Questo progetto è solo una tappa di un viaggio che avete iniziato voi anni fa.

ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRACIONES.....	VIII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
Resumen:.....	XIVIV
Abstract:	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Papel de la inflamación en la aterogénesis.	3
1.2 Inflamación sistémica y enfermedad coronaria.	8
1.3 Tratamientos antiinflamatorios y aterosclerosis.	9
1.3.1 Fármacos con dianas inflamatorias no específicas	11
1.3.2 Fármacos con dianas inflamatorias específicas	22
1.4 Modelo animal.....	25
1.5 Técnicas de imagen para la evaluación de la aterosclerosis: evidencia en humanos y aplicación en modelos animales.	27
2. HIPÓTESIS	33
3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	35
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
4.1 Diseño experimental.....	39
4.2 Dosis y vía de administración	42
4.3 Protocolo de imagen.....	43
4.3.1 Resonancia magnética.....	43
4.3.2 PET/CT con ¹⁸ F-FDG	44
4.3.3 Tomografía de coherencia óptica.....	45

4.3.4 Histología e inmunotinción	45
4.4 Análisis de laboratorio	46
4.5 Análisis estadístico	46
5. RESULTADOS	48
5.1 Características animales y perfil lipídico	49
5.2 Características de la enfermedad aterosclerótica	49
5.2.1 Análisis de la carga de placa	50
5.2.2 Análisis de la inflamación vascular	52
5.2.3 Tipología de la placa	54
5.2.4 Análisis de subgrupo en los conejos con los niveles de colesterol total más altos	55
6. DISCUSIÓN	57
6.1 De placa vulnerable a vulnerabilidad del árbol coronario	58
6.2 Carga total de placa	59
6.3 Actividad inflamatoria	60
6.4 Tipología de placa	62
6.5 Efectos de colesterol sobre la eficacia de la colchicina	62
6.6 Limitaciones	63
6.7 Próximas investigaciones sobre el papel de la colchicina como modulador de la aterosclerosis	65
7. CONCLUSIONES	66
8. BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1	Papel de la inflamación en el inicio y progresión de la placa aterosclerótica.....	7
Figura 2	Citoquinas pro y antiinflamatorias.....	9
Figura 3	Diseño del estudio.....	39
Figura 4.	Procedimiento de denudación arterial con balón.....	40
Figura 5	Correspondencia entre pruebas de imágenes y cortes histológicos....	41
Figura 6	Carga de placa.....	51
Figura 7	Inflamación vascular.....	53
Figura 8	Tipología de placa por tomografía de coherencia óptica.....	55
Figura 9	Análisis de subgrupo: carga de placa e inflamación vascular en los conejos con niveles de colesterol total más altos.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Fármacos y su mecanismo de modulación	
	antiinflamatoria documentado en aterosclerosis humana.....	10
Tabla 2	Publicaciones a favor del uso de la colchicina en la aterosclerosis.....	15
Tabla 3	Perfil lipídico y peso corporal.....	49
Tabla 4	Carga de placa.....	50
Tabla 5	Inflamación vascular.....	52
Tabla 6	Tipología de placa por tomografía de coherencia óptica.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

COX: ciclooxigenasa

COXIB: Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2

GM-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos

IL: interleuquina

IQR: rango intercuartil

IVUS: ultrasonidos intravasculares

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

NOS: óxido nítrico sintasa

NWI: Índice de pared normalizado

OCT: tomografía de coherencia óptica

PCR: proteína C-reactiva

PET: tomografía con emisión de positrones

PET/TC con ¹⁸F-FDG: tomografía por emisión de positrones con ¹⁸F-fluorodeoxiglucosa integrada con tomografía computarizada

ROI: regiones circulares de interés

RM: resonancia magnética

SUV: valores estandarizados de captación

TC: tomografía axial computarizada

TGF-β: factor transformador de crecimiento-beta

TNF-α: factor de necrosis tumoral-alfa

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1

Resumen:

EFFECTOS DE LA COLCHICINA SOBRE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA: ESTUDIO EN UN MODELO DE ATEROSCLEROSIS EN CONEJO.

Antecedentes. La aterosclerosis es una enfermedad vascular crónica y una de las principales causas de mortalidad en el mundo. En los últimos 50 años de investigación, se ha desvelado el papel fundamental de la inflamación en la aterosclerosis, tanto en sus etapas iniciales como en su progresión. Estudios de ciencia básica y traslacional han documentado múltiples mecanismos a través de los cuales la colchicina podría modular la inflamación presente en la placa aterosclerótica. Entre ellos, destacan la inhibición de la infiltración leucocitaria, la inhibición de la activación macrofágica y la inhibición de la activación del inflamosoma NLRP3 inducida por cristales de colesterol. Además, recientemente la colchicina ha demostrado beneficios clínicos en el tratamiento de la enfermedad coronaria estable. Nuestro objetivo fue evaluar los efectos de la colchicina sobre la progresión de la placa aterosclerótica.

Métodos. Para alcanzar nuestro objetivo se utilizó un modelo experimental de aterosclerosis en conejo y se realizó un amplio estudio de imagen en serie que incluyó imágenes de resonancia magnética (RM), tomografía por emisión de positrones con ^{18}F -fluorodeoxiglucosa integrada con tomografía computarizada (PET/TC con ^{18}F -FDG), tomografía de coherencia óptica (OCT) e inmunohistoquímica.

Se indujo aterosclerosis aórtica en 20 conejos machos de raza New Zealand White. El protocolo del estudio duró 36 semanas, durante las cuales los animales fueron alimentados con una dieta aterogénica (0.2% de colesterol). Además, en la segunda

semana se realizó la denudación endotelial de la aorta abdominal con balón. Después de 18 semanas, los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos para recibir colchicina por vía subcutánea o solución salina por vía subcutánea, y se siguieron durante otras 18 semanas. Antes de la aleatorización a los grupos experimentales y también al final del estudio, todos los animales se sometieron a RM y PET/TC con ^{18}F -FDG de la aorta abdominal. Inmediatamente después del sacrificio, las aortas fueron visualizadas por OCT y, posteriormente, se extrajeron muestras que se procesaron para el análisis histológico. La carga aterosclerótica se estimó como índice de pared aórtica normalizado en las imágenes de resonancia magnética y como volumen de calcio aórtico en las imágenes de TC. La inflamación vascular se evaluó mediante los valores estandarizados de captación de ^{18}F -FDG y por tinción de macrófagos con anticuerpo RAM-11. De las imágenes OCT, se evaluó la proporción de cuadrantes con placa lipídica respecto a la totalidad del vaso, el área luminal media y el espesor mínimo de la capa fibrosa. Las comparaciones estadísticas se hicieron usando la prueba U de Mann-Whitney para datos no apareados y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para datos apareados. Cada resultado se presentó como mediana y rango intercuartílico (IQR). El análisis inicial se realizó incluyendo la muestra total de cada grupo. Sucesivamente, se realizó un análisis de subgrupo dirigido a los conejos con el valor de colesterol total pre-aleatorización más alto.

Resultados. Durante la fase de tratamiento, el índice de pared normalizado de la aorta abdominal y el volumen de calcio aumentaron significativamente en ambos grupos. En el análisis general, no se observaron diferencias entre los dos grupos en relación a la progresión de la carga de placa. Sin embargo, en el análisis de subgrupo se evidenciaron diferencias significativas en los valores de índice de pared normalizado al final del

protocolo a favor de colchicina [0.47 (IQR 0.03) en el grupo colchicina frente a 0.52 (IQR 0.04) en el grupo placebo $p=0.029$]. En el análisis general la captación de ^{18}F -FDG disminuyó en el grupo de colchicina, mientras que aumentó en el grupo de placebo, con una tendencia hacia la significación [-10.9% (IQR 32.1%) en el grupo colchicina frente a + 13.7% (IQR 48.6%) en el grupo placebo; $p = 0.13$]. Esta tendencia alcanzó la significación estadística en el análisis de subgrupo, encontrándose diferencia a favor de colchicina en términos de captación de ^{18}F FDG al final del estudio [0.72 (IQR 0.06) en el grupo colchicina frente a 0.90 (IQR 0.09) en el grupo placebo $p=0.029$]. Sin embargo, no se observaron diferencias en términos de infiltración macrofágica. El análisis de las aortas por OCT no encontró diferencias en la tipología de las placas ateroscleróticas [94% (IQR 8%) de la aorta con placa lipídica en el grupo colchicina versus 93% (IQR 9%) en el grupo placebo, $p=0.88$], en el área luminal mínima [6.6 mm² (IQR 3.3 mm²) en el grupo colchicina versus 5.2 mm² (IQR 2.5 mm²) en el grupo placebo, $p=0.44$], ni en el espesor de la capa fibrosa mínima [119.1 μm (IQR 37.1 μm) en el grupo colchicina versus 113.0 μm (IQR 24.5 μm) en el grupo placebo, $p=0.88$].

Conclusiones. La tendencia divergente de la captación de ^{18}F -FDG en los dos grupos en el análisis general y las diferencias estadísticamente significativas encontradas en el análisis de subgrupo sugieren que la colchicina *in vivo* puede estabilizar la actividad inflamatoria dentro de la placa aterosclerótica sin alterar la infiltración de macrófagos o la tipología de placas.

Abstract:

EFFECTS OF COLCHICINE ON THE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE: STUDY IN A RABBIT MODEL OF ATHEROSCLEROSIS.

Background. Atherosclerosis is a chronic vascular disease and is one of the leading causes of mortality in the world. Over the last 50 years of research the fundamental role of inflammation in atherosclerosis has been unveiled. Basic and translational science studies have documented multiple mechanisms in support of the use of colchicine as modulator of the inflammation inside the atherosclerotic plaque. These physiological pathways include inhibition of leukocyte infiltration, inhibition of macrophage activation, and inhibition of the activation of the NLRP3 inflammasome induced by cholesterol crystals. In addition, colchicine has recently shown clinical benefits in the treatment of stable coronary disease. Our objective was to evaluate the effects of colchicine on the progression of atherosclerotic plaque.

Methods. To reach our objective, we used an experimental model of atherosclerosis in rabbits and we performed a large series of imaging of abdominal aortas, including magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography with ^{18}F -fluorodeoxyglucose integrated with computed tomography (PET / CT with ^{18}F -FDG), optical coherence tomography (OCT) and immunohistology.

Specifically, aortic atherosclerosis was induced in 20 male New Zealand White rabbits. The study protocol lasted 36 weeks, during which the animals were fed an atherogenic diet (0.2% cholesterol). In addition, in the second week, endothelial denudation with balloon of the abdominal aorta was performed. After 18 weeks, the animals were randomized into two groups to receive subcutaneously colchicine or saline

solution, and were followed for another 18 weeks. Prior to randomization and at the end of the study, all animals underwent MRI and PET / CT with ^{18}F -FDG of the abdominal aorta. Immediately after sacrifice, the aortas were visualized by OCT and subsequently extracted and processed for histological analysis. Atherosclerotic burden was estimated as normalized aortic wall index in MRI and as aortic calcium volume in CT images. Vascular inflammation was assessed by ^{18}F -FDG uptake values and by staining of macrophages with RAM-11 antibody. From the OCT images, the proportion of quadrants with lipid plaques over the entire vessel, the mean luminal area and the minimum thickness of the fibrous cap were evaluated. Statistical comparisons were made using the Mann-Whitney U test for unpaired data and the Wilcoxon signed-rank test for paired data. Each result is presented as median and interquartile range (IQR). The initial analysis was performed including the total sample of each group, successively a subgroup analysis was restricted to the rabbits with the higher values of pre-randomization total cholesterol.

Results. During the treatment phase, the normalized abdominal aortic wall index and the aortic calcium volume increased significantly in both groups. In addition, in the general analysis, no difference in plaque progression was observed between the two groups. However, in the subgroup analysis, there were significant differences in the normalized wall index values at the end of the protocol in favor of colchicine [0.47 (IQR 0.03) in the colchicine group versus 0.52 (IQR 0.04) in placebo $p=0.029$]. In general analysis, ^{18}F -FDG uptake declined in the colchicine group, whereas it increased in the placebo group with a trend toward significance [-10.9% (IQR 32.1%) in the colchicine group versus 13.7% (IQR 48.6%) on placebo; $P = 0.13$]. This trend reached statistical significance in the subgroup analysis showing a difference in the ^{18}F -FDG uptake in favor

of colchicine at the end of the study [0.72 (IQR 0.06) in the colchicine group versus 0.90 (IQR 0.09) in placebo $p=0.029$]. However, no differences were observed in the macrophagic infiltration. The analysis of the aorta by OCT found no difference in the typology of atherosclerotic plaques [94% (IQR 8%) of the aorta with lipid plaques in the colchicine group versus 93% (IQR 9%) in the placebo group, $p=0.88$], in the minimal luminal area [6.6 mm² (IQR 3.3 mm²) in the colchicine group versus 5.2 mm² (IQR 2.5 mm²) in the placebo group, $p=0.44$], nor in the thickness of the minimum fibrous cap [119.1 μ m (IQR 37.1 μ m) in the colchicine group versus 113.0 μ m (IQR 24.5 μ m) in the placebo group, $p=0.88$].

Conclusions. The divergent trend of ¹⁸F-FDG uptake observed in the general analysis and the statistically significant difference found in the subgroup analysis between the two groups suggest that colchicine *in vivo* may stabilize inflammatory activity within atherosclerotic plaques without altering the macrophagic infiltration or the plaque typology.

MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Papel de la inflamación en la aterogénesis.

La aterosclerosis es una enfermedad vascular crónica y representa una de las principales causa de mortalidad en el mundo [1]. Entre sus manifestaciones clínicas destacan la cardiopatía isquémica, el ictus isquémico y la vasculopatía periférica [2].

Durante la mayor parte del siglo XX, la aterosclerosis fue considerada una enfermedad de depósito de colesterol caracterizada por la recolección pasiva de lípidos y material trombótico en el interior de la pared vascular [3]. Sin embargo, los últimos 50 años de investigación han desvelado el papel fundamental de la inflamación en la aterosclerosis, tanto en sus etapas iniciales como en su progresión:

- El acúmulo inicial de lipoproteínas en la íntima arterial, bajo la forma de fosfolípidos oxidados y aldeídos de cadena corta originados de la oxidación de lipoproteínas, activa la transcripción genética de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) a través del factor nuclear-kB [4]. Por otra parte, citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina (IL)-1b y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) inducen la expresión endotelial de la proteína VCAM-1 [5, 6]. Esta proteína, junto con la selectina-P y la selectina-E, promueve el rodamiento y la adherencia leucocitaria a nivel endotelial [7, 8].
- Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos penetran en la íntima a través de la diapédesis. Este reclutamiento leucocitario depende de las quimioquinas expresadas en el ateroma. Entre éstas destaca por importancia la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). MCP-1, ligada a los proteoglicanos del lado luminal del endotelio, interactúa con su receptor, expresado prevalentemente por los monocitos y por los linfocitos T en fase de rodamiento,

produciendo así una adhesión firme. Esta interacción, mediada por integrinas, conduce a la diapédesis de los fagocitos mononucleares [9]. También participan en el proceso de extravasación leucocitaria la IL-8, implicada en el reclutamiento de los leucocitos polimorfonucleares, y la fractalquina, quimioatrayente para monocitos, linfocitos T y linfocitos natural killer [10].

- El monocito adquiere en la íntima características de macrófago tisular que conducen a la formación de células espumosas. En este proceso, los macrófagos aumentan la expresión de los receptores scavenger A y CD36 y, seguidamente, internalizan lipoproteínas modificadas por oxidación o glicación [11]. De esta manera, los ésteres de colesterol se acumulan en gotas citoplasmáticas formando macrófagos cargados de lípidos que adquieren el nombre de células espumosas. La producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y de la IL-3 induce la replicación de las células espumosas [12, 13].

- Las células espumosas no sirven simplemente como almacén para el exceso de lípidos. Estas células son una importante fuente de mediadores proinflamatorios que incluyen proteínas como citoquinas y quimioquinas, a parte de varios lípidos como el factor activador de plaquetas. Además, elaboran una gran cantidad de especies reactivas del oxígeno como el superóxido [14]. Este conjunto de mediadores inflamatorios promueve la inflamación en la placa y, por lo tanto, contribuye a la progresión de la lesión.

- A parte de la inmunidad innata, también la inmunidad adaptativa antígeno-específica cumple un papel relevante en la progresión de la placa [15, 16]. Los

macrófagos y las células dendríticas pueden presentar antígenos a los linfocitos T, que representan una importante minoría dentro de la lesión aterosclerótica. Entre los antígenos presentados encontramos lipoproteínas modificadas, proteínas de choque térmico y beta₂glicoproteína Ib. Los linfocitos activados secretan abundantes cantidades de citoquinas que modulan el proceso aterosclerótico. Según el tipo de linfocitos T activado se promueven diferentes procesos. Los linfocitos T helper CD4 subtipo 1 producen citoquinas proinflamatorias como interferón-gama, linfotoxina, ligando CD40 y factor de necrosis tumoral alfa. La activación de estas vías produce alteraciones en la placa que pueden conducir a la desestabilización y aumento de la trombogenicidad. Por otro lado, la activación de los linfocitos T helper CD4 subtipo 2 produce la IL-10, que puede inhibir la inflamación en el contexto de la aterogénesis [17]. Finalmente, la activación de linfocitos citolíticos CD8 puede producir el ligando Fas y otros factores citotóxicos que promueven la citólisis y la apoptosis de células espumosas, macrófagos y células endoteliales. La muerte celular dentro de la lesión aterosclerótica contribuye a la progresión de la placa y a sus complicaciones. Las células T reguladoras producen factor transformador de crecimiento-beta (TGF-beta) e IL-10, que pueden atenuar el proceso inflamatorio [18].

- Mientras las primeras fases del ateroma implican esencialmente alteraciones de la función endotelial y reclutamiento leucocitario, la sucesiva progresión involucra también la migración y proliferación de las células musculares lisas [19]. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas es una quimioquina secretada por macrófagos activados que recluta células musculares lisas. Estas células, en

el interior de la placa, muestran características fenotípicas modificadas, puesto que contienen un retículo endoplasmático rugoso prominente y una menor cantidad de fibras contráctiles. Su replicación no suele ser lineal a lo largo de la vida de una placa, presentando fases quiescentes y fases de mitosis acelerada. En los ateromas más avanzados, parte de las células musculares lisas progresan hacia la apoptosis en respuesta a citoquinas proinflamatorias [20].

- El metabolismo del colágeno dentro de la lesión aterosclerótica influye en su tendencia a la rotura. Factores que limitan la síntesis de colágeno por parte de las células musculares lisas reducen la capacidad de reparación y mantenimiento de la capa fibrosa de la placa. Por otra parte, el estímulo de la síntesis de colágeno refuerza su estructura. Por ejemplo, el interferón-gama producido por las células T inhibe la síntesis de colágeno, mientras que citoquinas secretadas por las plaquetas activadas promueven su síntesis. Además, los fenómenos de apoptosis descritos previamente reducen la posibilidad de síntesis de colágeno por parte de las células musculares lisas. Los macrófagos expresan en exceso metaloproteinasas de matriz y catepsinas que degradan el colágeno y la elastina de la matriz extracelular [21-23]. Por lo tanto, esta regulación dinámica, estrechamente relacionada con la actividad inflamatoria, condiciona las propiedades de resistencia de la capa fibrosa y, con ello, la posibilidad de complicaciones trombóticas.

Las etapas del proceso aterosclerótico están resumidas en la Figura 1.

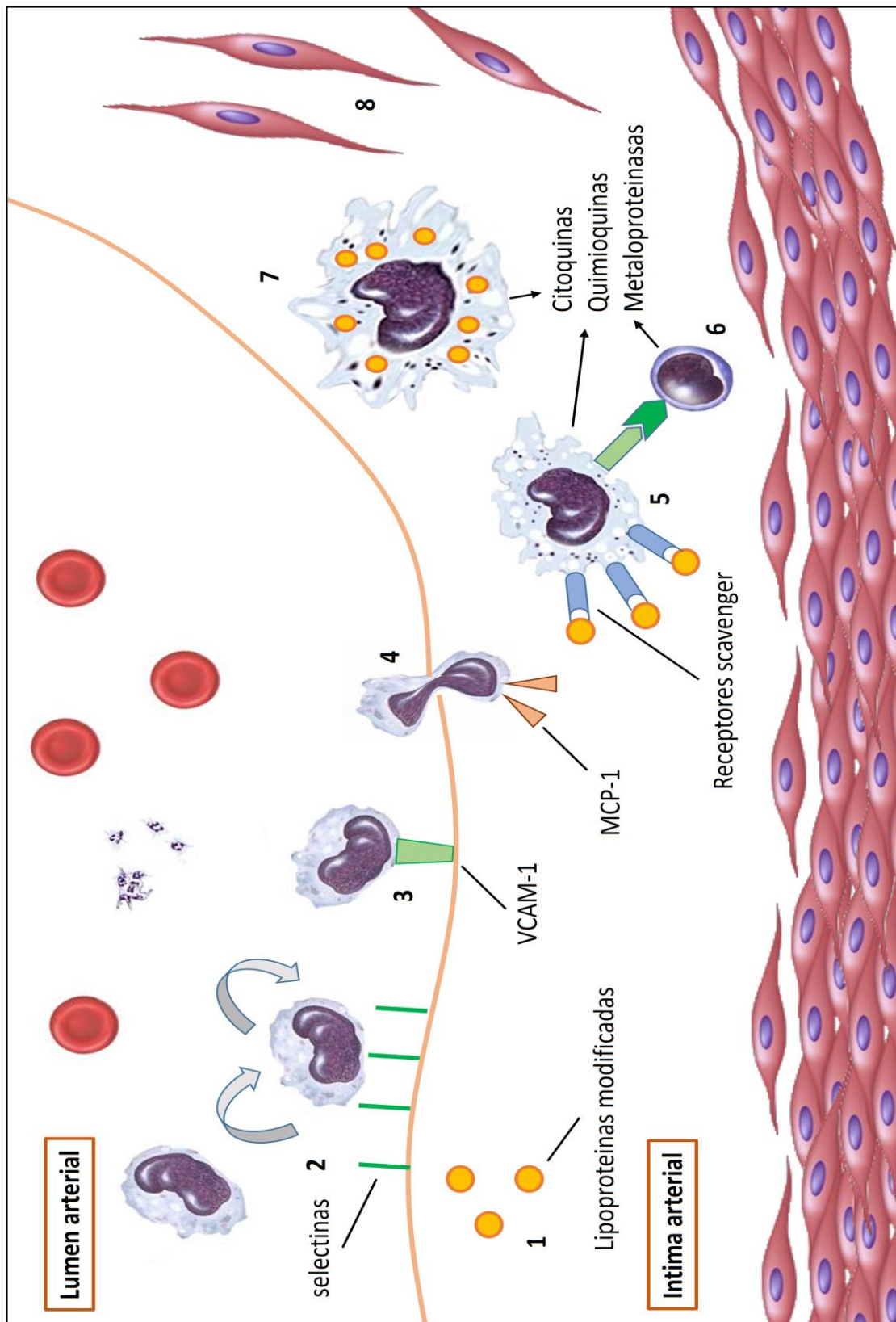


Figura 1. Papel de la inflamación en el inicio y progresión de la placa aterosclerótica. 1, Lipoproteínas modificadas en la íntima luminal empiezan el proceso inflamatorio. **2,** La expresión de selectinas en el endotelio permite la adherencia laxa de los monocitos

circulantes, empezando el fenómeno de rodamiento. **3**, Mediante moléculas de adhesión, los monocitos rodantes se adhieren de forma firme al endotelio. **4**, Las quimioquinas activan la diapédesis leucocitaria. **5**, Los monocitos se activan transformándose en macrófagos y exponen receptores scavenger con los que internalizar las lipoproteínas. **6**, Los macrófagos activan los linfocitos mediante la presentación de antígenos. **7**, Los macrófagos acumulan gotas de lípidos en su interior transformándose en células espumosas. El conjunto de macrófagos, linfocitos y células espumosa secreta quimioquinas, citoquinas y metaloproteinasas que promueven el proceso inflamatorio y el catabolismo de la matriz extracelular. **8**, Se reclutan células musculares lisas desde la media arterial. MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1; VCAM-1; molécula de adhesión celular vascular 1.

1.2 Inflamación sistémica y enfermedad coronaria.

La aterosclerosis no es una enfermedad inflamatoria focal y localizada en segmentos vasculares concretos. De hecho, en los pacientes que padecen un síndrome coronario agudo no se documenta un aumento de la actividad inflamatoria exclusivamente a nivel de la placa causante, sino un incremento difuso a lo largo del árbol coronario [24]. Además, estudios observacionales demuestran el vínculo entre placa aterosclerótica e inflamación sistémica. Por un lado, marcadores de inflamación sistémica como la proteína C-reactiva (PCR) están aumentados en pacientes con riesgo de eventos coronarios agudos [25, 26]. Por otro lado, pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas, como por ejemplo artritis reumatoide o psoriasis, tienen una mayor incidencia de eventos cardiovasculares [27].

El análisis de transcriptoma permite explorar la transcripción genética de un individuo los días previos a un evento. Aplicando esta técnica a pacientes que padecen un infarto agudo de miocardio se observa que el mRNA transcrito en las plaquetas codifica proteínas implicadas en la inflamación [28]. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la inflamación sistémica puede participar y preceder el evento agudo.

1.3 Tratamientos antiinflamatorios y aterosclerosis.

En el contexto de la aterosclerosis, y dependiendo de sus efectos, las citoquinas pueden clasificarse como pro- o anti-aterogénicas (ver Figura 2).

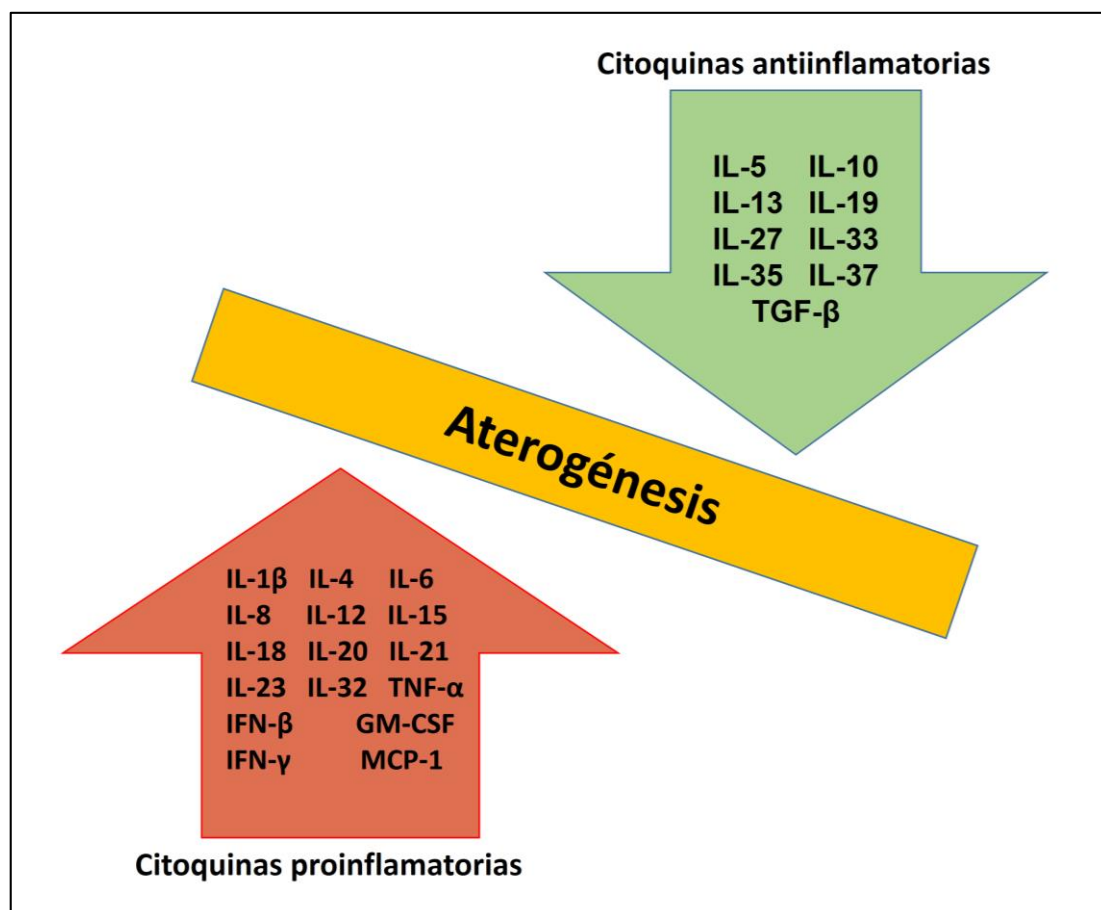


Figura 2. Citoquinas pro y antiinflamatorias. GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IFN, interferón; IL, interleuquina; MCP-1; proteína quimioatrayente de monocitos 1; TGF-b, factor transformador de crecimiento; TNF- α ; factor de necrosis tumoral- α .

Ante el concepto de aterosclerosis como enfermedad inflamatoria crónica [29], la investigación científica se ha centrado en las citoquinas como posibles dianas terapéuticas para la enfermedad aterosclerótica [5]. Las primeras evidencias que apoyaban el empleo de esta estrategia para el control de la aterosclerosis vinieron del tratamiento de enfermedades no cardiológicas. En concreto, se ha visto que el

tratamiento con metotrexato en la artritis reumatoide protege contra la aterosclerosis [30] y que la terapia anti-TNF- α está asociada a un menor riesgo para todos los eventos cardiovasculares [31]. Asimismo, a lo largo de los años, múltiples enfoques terapéuticos dirigidos al sistema cardiovascular, como estatinas [32] y antiplaquetarios [33], han puesto de manifiesto su capacidad para modificar las respuestas inmunológicas e inflamatorias en paralelo a sus efectos principales como hipolipemiantes y antiagregantes (ver Tabla 1).

Fármacos con dianas inflamatorias no específicas:	
Estatinas	↓VCAM-1, ↓ trombomodulina, ↑NOS endotelial
Ácido acetilsalicílico	↓ PCR, ↓ IL-6, ↓M-CSF
Metotrexato	↓ selectina E, ↓ VCAM-1, ↓ ICAM-1
Colchicina	↓ PCR
Fármacos con dianas inflamatorias específicas:	
Anti TNF- α	↓ ICAM, ↑ función endotelial
Anti IL-1	↓ PCR, ↓ IL-6
Anti IL-6	↑ función endotelial
Anti IL-1 β	↓ PCR, ↓ IL-6, ↓ fibrinógeno

Tabla 1. Fármacos y su mecanismo de modulación antiinflamatoria documentado en aterosclerosis humana. VCAM, molécula de adhesión celular vascular; ICAM, molécula de adhesión intercelular; NOS, óxido nítrico sintasa; PCR, proteína-C reactiva; IL, interleuquina; M-CSF, factor estimulante de colonia de monocitos.

En general, los enfoques antiinflamatorios en la aterosclerosis pueden dividirse en dos grandes categorías. La primera incluye fármacos con propiedades antiinflamatorias de base amplia, como estatinas, aspirina, metotrexato y colchicina. La segunda incluye el tratamiento antiinflamatorio con inhibidores específicos de citoquinas de la vía inflamatoria.

1.3.1 Fármacos con dianas inflamatorias no específicas

Colchicina:

La colchicina es un alcaloide extraído de la flor *Colchicum autumnale*. En el Papiro Ebers, un papiro médico del 1500 a.C., ya se describen las propiedades beneficiosas de la planta de la colchicina para el tratamiento del reumatismo y del edema. Fue el médico griego Pedanio Dioscorides, en el siglo I d.C., quien describió por primera vez el empleo del extracto de *Colchicum* para el tratamiento de la gota. Desde entonces, ha sido empleada en el tratamiento de enfermedades reumatológicas como la gota [34] o la fiebre mediterránea familiar [35] debido a sus propiedades antiinflamatorias.

En cardiología, su empleo en la pericarditis aguda ha demostrado ser seguro y eficaz, siendo actualmente un tratamiento de primera línea [36]. Además, un estudio reciente ha demostrado que puede reducir la recurrencia de fibrilación auricular tras el procedimiento de ablación de las venas pulmonares [37]. El posible efecto beneficioso de la colchicina sobre la aterosclerosis fue propuesto tras evaluar la prevalencia de enfermedad cardiovascular en los pacientes con fiebre mediterránea familiar. Esta población, que se encuentra en tratamiento crónico con colchicina, representa el grupo ideal para analizar los posibles efectos beneficiosos de la colchicina más allá de la enfermedad reumatológica. Al ser la fiebre mediterránea familiar una enfermedad inflamatoria crónica, se esperaría que se asociara con una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular, como suele ocurrir con las demás enfermedades inflamatorias sistémicas crónicas. Sin embargo, esta población presenta una incidencia de infartos de miocardio similar a la de la población sana, lo que sugiere un posible efecto protector de la colchicina [38]. Asimismo, en esta misma población se ha

documentado una rigidez arterial similar a la de la población general, lo que apoya la hipótesis del efecto protector de la colchicina [39]. En los pacientes con gota el empleo de colchicina no es crónico. Sin embargo, representan la población más expuesta al uso de colchicina, puesto que la gota es una enfermedad mucho más difusa que la fiebre mediterránea familiar. En un estudio retrospectivo con 1288 pacientes se analizó la incidencia de infartos en la población de enfermos con gota en función de su exposición a colchicina, alopurinol, colchicina junto con alopurinol o ningún tratamiento. Los pacientes expuestos a colchicina mostraron una menor incidencia de infarto de miocardio en el seguimiento (0.6% vs 3.08%; RR 0.19, $p = 0.01$) [40], sin que hubiese diferencias en edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular. Resultados similares se confirmaron en otro estudio retrospectivo [41]. El primer estudio prospectivo en pacientes con cardiopatía isquémica estable exploró la capacidad de la colchicina a bajas dosis (0.5mg cada 12 horas) de reducir los niveles de PCR ultrasensible, un reconocido marcador de aterosclerosis activa. El estudio demostró que la colchicina, en el paciente isquémico crónico, reducía los niveles de PCR ultrasensible, siendo este efecto independiente de la pauta de ácido acetilsalicílico y atorvastatina [42].

Recientemente, en el ensayo LoDoCo (un estudio prospectivo, aleatorizado y ciego para el observador) la colchicina añadida a la terapia estándar de prevención secundaria en pacientes con enfermedad coronaria estable redujo la incidencia de síndrome coronario agudo (4.6% vs 13.4%; HR 0.33; IC95% 0.18 a 0.63; $p < 0.001$) [43]. Estos resultados no se pueden considerar concluyentes, puesto que el estudio LoDoCo sólo incluía a 500 pacientes, en él no se comparaba la colchicina con placebo y, además, no era ciego para el paciente. De cara a superar estas limitaciones, se está desarrollando el estudio LoDoCo 2 con el objetivo de incluir a 4.250 pacientes y ser controlado con

placebo. Además, en un estudio reciente con 192 pacientes diabéticos, la colchicina ha demostrado reducir la incidencia de reestenosis intrastent en la cardiopatía isquémica estable tratada con implante de stent no recubierto (16% versus 33%; OR 0.38; IC95% 0.18 a 0.79 $p = 0.007$) [44].

Múltiples mecanismos apoyan el uso de la colchicina como modulador de la inflamación presente en la placa aterosclerótica [45-47]:

-En la gota y pseudogota, el urato monosódico y los cristales de deshidratación de pirofosfato de calcio absorbidos por los macrófagos estimulan al inflamosoma, lo que genera la secreción de IL-1 β [48]. La colchicina se concentra particularmente en el interior de los leucocitos y, gracias a su capacidad para suprimir la expresión macrofágica del gen MEFV, junto con su unión a la tubulina, altera el ensamblaje del inflamosoma NLRP3 y la producción de IL-1 β , reduciendo así el reclutamiento de células inflamatorias. En los macrófagos cargados de colesterol, la cristalización del colesterol puede desencadenar una activación similar del inflamosoma NLRP3 y, por lo tanto, tener un papel crucial en la aterosclerosis [49]. Por otra parte, la colchicina, in vitro, ha mostrado reducir la producción de superóxido inducida por el urato monosódico en los neutrófilos [50].

- La colchicina inhibe la formación de microtúbulos en el citoesqueleto, lo que conduce a la disminución del transporte y secreción de vesículas. También inhibe específicamente la fosforilación de tirosina, lo que conduce a la disminución de la producción del leucotrieno B₄, responsable de la adhesión y activación de los leucocitos sobre el endotelio [51]. Además, recientemente se ha descubierto que

los microtúbulos endoteliales tienen un papel central en la diapédesis de los monocitos, y que la alteración de los mismos, mediante fármacos similares a la colchicina, produce una inhibición del reclutamiento monocitario [52].

- En ratones, la colchicina altera la distribución de selectina-E en la superficie endotelial y disminuye la expresión de selectina-L [53]. Además, también altera la tubulina de los neutrófilos, reduciendo así su movilidad, adhesión y activación.[54].

- El potencial de los cristales de colesterol para desempeñar un papel causal en la aterosclerosis es apoyada por experimentos en animales. Se ha observado que, inyectando cristales de colesterol en la pared arterial, se pueden inducir lesiones ateroscleróticas [55]. Los cristales de colesterol también se han detectado en las placas iniciales [56] y su presencia se reconoce como un predictor de inestabilidad en la enfermedad más avanzada [57].

- En un modelo murino de hipertensión pulmonar, la colchicina redujo la proliferación de células musculares lisas y la producción de TNF- α y NF-kB [58].

- La colchicina in vitro disminuye la agregación plaquetaria sólo a concentraciones supratrapéuticas, pero a concentraciones terapéuticas disminuye la adherencia de plaquetas a monocitos y neutrófilos [59].

- El uso de la colchicina como inhibidor de la neoaterosclerosis intrastent se ve respaldada por el hecho de que este fármaco comparte con el paclitaxel, una molécula usada para el recubrimiento de los stents farmacológicos, la capacidad de inhibir el ensamblaje microtubular [60] y, por lo tanto, la proliferación celular.

En un modelo de angioplastia en perros, la colchicina redujo la hiperplasia intimal y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular [61].

- En un antiguo estudio con un modelo de aterosclerosis en conejo basado en una dieta rica en colesterol, la administración de colchicina por vía intraperitoneal redujo la incidencia de placas de colesterol en aorta. Sin embargo, el grupo que recibió colchicina también desarrolló menor dislipemia [62]. Esto sugiere que la menor aterogénesis observada pudo ser secundaria a los menores niveles de colesterol en sangre y no a un beneficio directo de la colchicina, puesto que la colchicina no modula los niveles de colesterol.

- Recientemente, en el Congreso Europeo de Cardiología de 2015, se han presentado en formato póster los resultados preliminares sobre el uso de colchicina en un modelo de aterosclerosis en conejo basado en una dieta rica en colesterol. La colchicina redujo el remodelado negativo de la aorta y la infiltración de macrófagos, analizados por ecografía e inmunotinción respectivamente [63]. Estos efectos fueron más marcados en los conejos que desarrollaron mayor dislipemia. Los resultados definitivos del estudio no han sido todavía publicados.

En la siguiente tabla se recogen las publicaciones que apoyan la hipótesis de que la colchicina podría tener efectos beneficiosos sobre la aterosclerosis:

Publicación	Tipo de estudio	Resultados
Langevitz, P. et al 2001	Estudio de cohorte retrospectivo, en humanos	Pacientes con FMF tienen una incidencia de infartos similar a la población general.
Kukuy, O. et al 2017	Estudio transversal, en humanos	Pacientes con FMF tienen una rigidez arterial similar a la población general.

Crittenden, D.B. et al 2012 Solomon, D.H. et al 2016	Estudios de cohorte retrospectivo, en humanos	Pacientes con gotas expuestos a colchicina tienen menor incidencia de infartos que los no expuestos.
Nidorf, M. y Thompson P.L. 2007	Ensayo clínico aleatorizado, en humanos	La colchicina reduce la PCR ultrasensible en pacientes con cardiopatía isquémica estable.
Nidorf, S.M. et al 2013	Ensayo clínico aleatorizado, en humanos	La colchicina reduce los síndromes coronarios agudos en pacientes con cardiopatía isquémica estable.
Deftereos, S. et al 2013	Ensayo clínico aleatorizado, en humanos	Bajas dosis de colchicina reducen la reestenosis de stent convencional en pacientes diabéticos.
Chia, E.W. et al 2008	Modelo murino de gota, in vivo.	La colchicina reduce la producción neutrofílica de superóxido.
Martinon F. et al 2006 [48]	Células leucocitarias murinas, in vitro	La colchicina reduce el ensamblaje de inflamosoma NLRP3 y la producción de IL-1 β inducida por cristales de colesterol.
Mamdouh, Z. et al 2008 [52]	Células endoteliales humanas, in vitro	Colcemide, una molécula similar a la colchicina, altera los microtúbulos y reduce la diapédesis leucocitaria.
Cronstein, B.N. et al, 1995[53]	Células endoteliales y neutrófilos, in vitro	La colchicina altera la distribución endotelial de selectina E y disminuye la expresión de selectina L.
Asako, H. et al. 1992	Células mesentéricas murinas, in vivo	La colchicina reduce la adherencia y trans migración leucocitaria.
Lee, F.Y. et al. 2013 [58]	Modelo murino de hipertensión pulmonar, in vivo	La colchicina reduce la expresión de TNF- α y NF- κ B.
Atta, H.M. et al 2008 [61]	Modelo animal de angioplastia en perros, in vivo	La colchicina reduce la hiperplasia intimal y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular.
Wojcicki, J. et al 1986 [62]	Modelo animal de aterosclerosis en conejos con dieta enriquecida en colesterol, in vivo	La colchicina reduce la presencia macroscópica de aterosclerosis en la aorta.

Merlet, N et al. 2015 (Poster) [63]	Modelo animal de aterosclerosis en conejos con dieta enriquecida en colesterol, in vivo	La colchicina reduce el remodelado negativo y la infiltración de macrófagos, especialmente en los conejos con niveles de colesterol más alto.
-------------------------------------	---	---

Tabla 2. Publicaciones a favor del uso de la colchicina en la aterosclerosis. FMF, Fiebre Mediterránea Familiar.

La colchicina tiene una ventana terapéutica estrecha. Sin embargo, las dosis empleadas hasta ahora en las enfermedades cardiológicas son bajas y no producen efectos adversos mayores. Los efectos adversos más frecuentes con la pauta oral habitual son gastrointestinales (diarrea, náuseas, dolor abdominal o vómitos), pueden aparecer hasta en el 10% de los pacientes y suelen ser leves y dosis dependientes [64]. Estos efectos adversos podrían reducirse con el desarrollo de diferentes formulaciones y vías de administración del fármaco.

Ácido acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico es un inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa-1 y a bajas dosis es ampliamente utilizado para la prevención de eventos cardiovasculares [65]. A dosis altas (500-1000mg) actúa como antiinflamatorio, reduciendo la producción de prostaglandinas e inhibiendo vías de señalización proinflamatorias como NF- κ B. Sin embargo, a altas dosis, la inhibición de la producción endotelial de prostaciclina conlleva un mayor riesgo cardiovascular [66]. A dosis bajas (75-150mg) predominan las propiedades antiplaquetarias, a través de la inhibición del tromboxano B₂, un eicosanoide protrombótico también implicado en el tráfico de leucocitos

polimorfonucleares [67]. Modelos animales apoyan la hipótesis de que el ácido acetilsalicílico a bajas dosis puede modular la inflamación de la placa aterosclerótica.

En modelos murinos de aterosclerosis, dosis bajas de ácido acetilsalicílico reducen la inflamación vascular y estabilizan la placa [68]. Esto puede ser debido a una reducción de la expresión de fractalcina y quemerina, ambas quimioquinas expresadas en la placa aterosclerótica [69, 70]. Además, se ha observado que a dosis bajas el ácido acetilsalicílico previene la disfunción endotelial inducida por la inflamación [71] y, en pacientes con angina estable, disminuye los niveles plasmáticos de varios marcadores inflamatorios y citoquinas tales como IL-6, CRP y factor estimulante de colonias de monocitos [33]. Por último, la eficacia del ácido acetilsalicílico en la prevención de eventos cardiovasculares es proporcional a los niveles de inflamación subyacente medidos por PCR, observación que apoya la hipótesis de que sus beneficios clínicos se deban también a su efecto antiinflamatorio [72].

El uso de ácido acetilsalicílico en la prevención primaria del paciente estable con estenosis coronarias no obstructivas (<50% en la coronariografía) es cuestionable. En esta población, se ha documentado que la mortalidad es proporcional a la extensión de la enfermedad en el árbol coronario y que las estatinas mejoran la supervivencia. Sin embargo, el uso de ácido acetilsalicílico no se acompaña de un beneficio clínico [73]. El ácido acetilsalicílico tampoco ha evidenciado una reducción de los infartos en la población diabética con enfermedad arterial periférica [74] y su uso en pacientes con insuficiencia renal crónica ha sido asociado a un aumento de los eventos ateroscleróticos [75].

De todos modos, ninguno de estos estudios estratificó la población incluida según su carga inflamatoria. De haber realizado una estratificación de este tipo, por ejemplo a través de la medición de PCR ultrasensible basal, se hubiera podido explorar si los pacientes con mayor inflamación subyacente se hubieran beneficiado del uso de ácido acetilsalicílico en prevención primaria.

Estatinas

Las estatinas ejercen un efecto hipolipemiante por ser inhibidoras de la HMG-CoA reductasa y son empleadas en la prevención de eventos cardiovasculares. Han demostrado modular la respuesta inflamatoria por medio de diferentes mecanismos [76]. Por ejemplo, reducen los niveles de trombomodulina, IL-1 y la expresión inducida de VCAM-1 por TNF- α [77]. Además, estimulan la óxido nítrico sintasa endotelial y la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 [78].

Su efecto antiinflamatorio se ve respaldado por el hecho de que la reducción de los niveles de PCR secundaria al tratamiento con estatinas es independiente de la reducción de los niveles de colesterol LDL. Por todo ello, actualmente se acepta que las estatinas no son antilipemiantes puros y que parte de sus beneficios clínicos se deben a su capacidad de modular la inflamación [79]. El tratamiento con estatinas basado en el perfil inflamatorio del paciente en vez de en su perfil lipídico ya ha demostrado ser eficaz. En un estudio en pacientes sin cardiopatía isquémica crónica se demostró que la lovastatina prevenía síndromes coronarios agudos en los sujetos con alta PCR a pesar de poseer un perfil lipídico no desfavorable. En concreto, tras 5 años de seguimiento se documentó que, en pacientes con niveles de PCR mayores de 0.16 mg/dL, el número necesario a tratar para evitar un evento coronario era 49 [80]. De forma similar, la

rosuvastatina demostró reducir los eventos coronarios en pacientes con PCR ultrasensible basal mayor de 2mg/L y perfil lipídico normal. Además, su máxima reducción de eventos fue en los pacientes que durante el tratamiento alcanzaron niveles de PCR ultrasensible menores de 1mg/L [81].

Metotrexato

El metotrexato es un fármaco antimetabolito que actúa inhibiendo el metabolismo del ácido fólico. Además, se ha documentado que puede modular la expresión de ICAM-1, selectina-E, VCAM-1 e IL-6 [82]. Estudios realizados en pacientes reumatológicos han demostrado que el metotrexato a bajas dosis puede disminuir el riesgo cardiovascular en pacientes con una enfermedad inflamatoria crónica. En concreto, en pacientes con artritis reumatoide, el metotrexato proporciona un beneficio sustancial de supervivencia, en gran medida debido a la reducción de la mortalidad cardiovascular [83].

Actualmente se están realizando ensayos clínicos para demostrar su eficacia en la población cardiovascular. Por ejemplo, el Cardiovascular Inflammation Reduction Trial (CIRT) tiene previsto reclutar 7000 pacientes para comprobar el papel del metotrexato en el tratamiento de los pacientes con cardiopatía isquémica estable y elevación persistente de PCR ultrasensible [84].

Corticoides

Los corticoides son fármacos antiinflamatorios ampliamente empleados en el ámbito médico no cardiológico, que actúan sobre la inmunidad mediada por células. Concretamente, reducen las células T circulantes, inhiben el factor de crecimiento de las

células T y antagonizan la acción de los factores que inhiben la migración celular. La alteración de estos mecanismos conlleva un enlentecimiento de la reparación tisular que, en el contexto de un infarto agudo, puede desembocar en una rotura cardíaca [85]. Por otra parte, la reducción de la inflamación en el infarto agudo podría reducir el área de infarto [86]. El principal problema de cara a sacar conclusiones para el uso actual de los corticoides en el manejo del infarto agudo es que la mayoría de los estudios se realizaron en una era pre-reperusión miocárdica. Sin embargo, su uso crónico se asocia claramente con un aumento de los infartos por inestabilidad de la placa aterosclerótica, alteración de la función endotelial y producción de un estado protrombótico [87].

Inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben tanto la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Estas dos enzimas tienen efectos opuestos en los vasos coronarios. La COX-1 existe dentro de las plaquetas y es responsable de la producción de tromboxano A₂, que induce vasoconstricción y agregación plaquetaria. La enzima COX-2 predomina en la célula endotelial de las paredes arteriales y es responsable de la generación de prostaciclina, que inhibe la agregación plaquetaria y provoca vasodilatación. Por su efecto sobre la COX-2, estos fármacos están asociados a un aumento de los eventos coronarios [88]. Se incluye en este grupo el ácido acetilsalicílico a altas dosis y otros fármacos de amplia comercialización como ibuprofeno, ketorolaco o indometacina, por ejemplo.

Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (Coxib)

La COX-2 se induce por inflamación, mientras que la COX-1 está presente de forma estable en el organismo. En el estómago la COX-1 potencia los mecanismos de

defensa que limitan el desarrollo de úlceras gástricas. Por esta razón, los inhibidores no selectivos de la cicloxigenasa están asociados con un mayor riesgo de sangrado gástrico, mientras que los inhibidores selectivos, bajo este punto de vista, tienen un mejor perfil de seguridad. Sin embargo, la inhibición selectiva de COX-2 permite la actividad sin oposición de la COX-1 plaquetaria, que lleva a la síntesis de tromboxano 2A y a un estado protrombótico que ocasiona una mayor mortalidad cardiovascular [89].

1.3.2 Fármacos con dianas inflamatorias específicas

Inhibidores del TNF- α

Infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab y certolizumab son agentes anti-TNF- α actualmente en uso para el manejo de enfermedades reumatológicas como la espondilitis anquilosante y la artritis reumatoide. El golimumab, comparado con placebo, ha demostrado limitar la progresión del daño vascular en términos de rigidez arterial y de grosor íntima-media en pacientes con espondilitis anquilosante [90]. Un meta-análisis reciente ha documentado que el tratamiento de la artritis reumatoide con anti-TNF- α se asocia a un menor riesgo de eventos cardiovasculares [31]. Estos resultados beneficiosos de los anti-TNF- α parecen ser secundarios a su capacidad de modular la inflamación vascular. En concreto, el estudio de la adherencia leucocitaria al endotelio a través de cámaras de flujo ha evidenciado que el tratamiento con anti-TNF- α disminuye las interacciones leucocito-endotelio inducidas por estímulos inflamatorios [91]. Lamentablemente, no se dispone de estudios clínicos dirigidos a poblaciones con cardiopatía isquémica.

Inhibidores de la IL-1

La IL-1 es producida por los leucocitos y ejerce importantes funciones sobre el endotelio y las células del músculo liso vascular. Las respuestas endoteliales a la IL-1 incluyen la modulación de las propiedades hemostáticas y la adhesión de los leucocitos [92], mientras que las células del músculo liso vascular expuestas a esta citoquina producen prostanoïdes e IL-6 [93]. El descubrimiento de que los macrófagos inician la producción de IL-1 β a través del inflamosoma como respuesta a la acumulación de colesterol generó interés por investigar esta citoquina en el contexto de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

El canakinumab es un anticuerpo monoclonal humano que se une al IL-1 subtipo beta (IL-1 β) y bloquea su interacción con el receptor. En un modelo de ratón aterosclerótico, se ha observado que la inhibición de la IL-1 orienta a los macrófagos tisulares a un fenotipo anti-inflamatorio y que las lesiones ateroscleróticas se reducen [94]. Además, se ha demostrado que canakinumab reduce eficazmente la hemoglobina glicada, la glucemia, la PCR, la IL-6 y los niveles de fibrinógeno en pacientes con diabetes mellitus bien controlada y alto riesgo cardiovascular [95]. El estudio CANTOS (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study), un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego, se centra en pacientes post-infarto de miocardio con elevación persistente de la PCR ultrasensible [96]. En el momento en que se escribe esta tesis, la casa comercial del fármaco afirma haber completado el estudio alcanzando el objetivo primario combinado de reducción de muerte cardiovascular, infarto no fatal o ictus no fatal. Sin embargo, los resultados aún están pendientes de presentación en el próximo Congreso Europeo de Cardiología [97].

Inhibidores del IL-6

El tocilizumab es un anticuerpo monoclonal que antagoniza la IL-6 circulante. Estudios celulares han objetivado que la PCR promueve activamente un fenotipo pro-aterosclerótico y proinflamatorio. Estos efectos están mediados, en parte, por la producción de IL-6 y son atenuados a través de la inhibición de la IL-6 [98]. En un estudio de fase II se ha mostrado que el tratamiento con tocilizumab atenúa significativamente la inflamación y la liberación de troponina-T periintervencionismo percutáneo en pacientes con infarto agudo de miocardio sin elevación del ST [99].

Antagonistas de la subunidad p40 (Inhibidores del IL-12 e IL-23)

La IL-12 y la IL-23 comparten en su estructura la subunidad p40 y son citoquinas que median la función de los linfocitos-T-helper-17. Estas células han sido identificadas como un grupo de leucocitos pro-aterogénico dentro de la placa aterosclerótica. Sin embargo, el uso de ustekinumab y briakinumab en pacientes con psoriasis puede incluso aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares [100].

Inhibidores de la IL-17

El brodalumab es un inhibidor del receptor A de la IL-17, mientras que ixekizumab y secukinumab son antagonistas de la IL-17A. Los tres son fármacos empleados en la psoriasis. La IL-17 es pro-aterogénica y es producida por los linfocitos-T-helper-17. En un modelo murino de aterosclerosis, la inhibición de la IL-17 condujo a una reducción de la lesión aterosclerótica temprana [101]. Sin embargo, falta experiencia en aterosclerosis humana.

Agentes anti-P-selectina

La P-selectina es una molécula de adhesión celular que organiza las células endoteliales y las interacciones plaquetarias. Esta proteína desempeña un papel en la activación de leucocitos, la formación de trombos y la formación neointimal.

En el estudio SELECT ACS, el uso previo a intervencionismo percutáneo de P-selectina en pacientes con infarto de miocardio sin elevación de ST produjo una menor elevación de marcadores de daño miocárdico comparado con placebo [102]. Sin embargo, en el estudio SELECT-CABG, el empleo de inclacumab no redujo la incidencia de enfermedad de injerto de safena al año de la cirugía de revascularización [103].

1.4 Modelo animal.

Los conejos son muy sensible a las dietas ricas en colesterol y acumulan grandes cantidades de colesterol en su plasma. Por primera vez, en el año 1.922, Clarkson y Newburgh indujeron placas de aterosclerosis en la aorta de conejos a través de una dieta rica en colesterol [104]. Las placas eran similares a las observadas en la aterosclerosis humana. Desde entonces, la dieta hipercolesterolémica en conejos se ha convertido en el modelo experimental más utilizado de aterosclerosis.

El término "disfunción endotelial" se utiliza para describir situaciones en las que el endotelio pierde sus propiedades vasoprotectoras y representa la fase inicial de varios procesos de lesión vascular como la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión arterial [105]. Los niveles basales de óxido nítrico y de vasodilatadores derivados del endotelio son más marcados en las aortas de las hembras que en las de los conejos macho, debido probablemente a un efecto protector del estradiol. Por esta razón, las

hembras son menos susceptibles a la formación de lesiones ateroscleróticas en respuesta a la dieta rica en colesterol [106]. Además, aparentemente, la formación de lesiones avanzadas depende de la edad del animal. Los conejos envejecidos, con una edad entre 3 y 4,5 años, muestran placas fibróticas, mientras que en los animales jóvenes, de aproximadamente 4 meses de edad, predominan las estrías lipídicas [107]. Por otra parte, el grado de aterosclerosis en conejos tiende a ser mayor en la aorta abdominal respecto a la aorta torácica. Esto se debe, probablemente, a un efecto hemodinámico secundario al hecho de que la aorta abdominal va reduciendo gradualmente su calibre [108].

En la aorta de los modelos experimentales se observan varios tipos de placas que van desde las estrías lipídicas hasta las lesiones ateromatosas, dependiendo del grado de ingesta de colesterol. Las dietas que contienen <0.15% de colesterol desarrollan lesiones tipo estrías lipídicas, mientras que las placas ateromatosas se encuentran más frecuentemente cuando hay mayores cantidades de colesterol [109]. Con un contenido de colesterol en la dieta entre 0.5% y 4% los conejos se convierten rápidamente en hipercolesterolémicos (colesterol > 1000 mg/dl) y las lesiones creadas consisten principalmente en células espumosas derivadas de macrófagos. Sin embargo, las dietas con altas cantidades de colesterol desarrollan una marcada hepatotoxicidad que limita el uso del modelo. En conejos alimentados con dietas enriquecidas al 0.2% de colesterol, se han documentado en las 3 primeras semanas leucocitos adheridos a la aorta torácica y abdominal. En el mes sucesivo se encontraron numerosas células espumosas en el espacio subendotelial que produjeron desarrollo de estrías lipídicas.

El desarrollo de la placa aterosclerótica de mayor vulnerabilidad puede ser estimulado a través de un proceso de deendotelialización mediante una lesión de la pared arterial inducida por balón. Esta lesión se realiza habitualmente con un catéter Fogarty que se introduce a través de la arteria femoral. Se avanza con el catéter de forma retrógrada hasta la aorta torácica, se infla el globo y se retrae el catéter hasta la bifurcación ilíaca. Se ha observado que esta técnica da lugar a placas morfológicamente similares a las placas avanzadas inducidas por la dieta con altas cantidades de colesterol. Además, se ha demostrado que el endotelio que se regenera después de la deendotelialización con balón es fisiológicamente disfuncional durante un período prolongado de tiempo y que tiene una mayor vulnerabilidad y susceptibilidad a la trombosis [110]. Este modelo se usa para probar agentes farmacológicos que podrían reducir el desarrollo de placas ateroscleróticas vulnerables.

1.5 Técnicas de imagen para la evaluación de la aterosclerosis: evidencia en humanos y aplicación en modelos animales.

Las nuevas técnicas de imagen permiten la detección, cuantificación y caracterización de la aterosclerosis a nivel de distintos territorios vasculares. Las principales técnicas no invasivas actualmente empleadas para el estudio de la aterosclerosis son la ecografía, la tomografía axial computarizada (TC), la resonancia magnética (RM) y la tomografía por emisión de positrones (PET). Entre las técnicas invasivas, más allá de la coronariografía, encontramos los ultrasonidos intravasculares (IVUS) y la tomografía de coherencia óptica (OCT)

Resonancia magnética

La RM se ha convertido en un excelente método para evaluar la pared de los vasos en la enfermedad aterosclerótica avanzada de forma no invasiva y sin exponer al paciente a radiaciones ionizantes. En arterias de gran calibre, como carótidas y aorta, la valoración tridimensional del vaso permite cuantificar su volumen de forma precisa y reproducible, ofreciendo una estimación representativa de la carga aterosclerótica del individuo [111]. Además, en placas de gran volumen, la RM permite diferenciar la composición de la placa, pudiendo detectar características de vulnerabilidad como la extensión del núcleo lipídico y/o la presencia de hemorragia o neovasos dentro de las placas [112]. El estudio de las arterias coronarias por RM presenta limitaciones técnicas debidas a su pequeño calibre y a su tortuosidad, a parte del continuo movimiento cardíaco y respiratorio. Por esta razón, el uso de esta técnica no es parte de la práctica habitual.

El empleo de la RM para la valoración de los cambios seriados en la carga aterosclerótica de la aorta en conejos ha sido extensamente validado [113]. De hecho, la cuantificación de la aterosclerosis por RM se está empleando en estudios experimentales para valorar la respuesta terapéutica a diversos tratamientos en términos de progresión o regresión de la placa [114]. El volumen del vaso se mide como la suma del área de la pared del vaso en cada corte (área de la pared externa menos área del lumen). Sin embargo, el estimador de la carga de placa para valorar la respuesta al tratamiento y comparar los grupos experimentales es el Índice de Pared Normalizado (volumen de la pared aórtica dividido por el volumen total del vaso), ya que ajusta la medida al tamaño del vaso.

PET/TC con 18-fluorodesoxiglucosa

La 18-fluorodesoxiglucosa (^{18}FDG) compete con la glucosa para ser captado por parte de células metabólicamente activas. La captación vascular de ^{18}FDG se correlaciona con la inflamación en la placa de aterosclerosis, ya que el ^{18}FDG es retenido ávidamente por los macrófagos activados dentro de la lesión vascular [115]. En humanos, la mayor captación vascular de ^{18}FDG es un indicador de inestabilidad de la placa, puesto que ha sido relacionada con un mayor riesgo de eventos isquémicos [116]. Además, la técnica ha demostrado tener una buena reproducibilidad intra e inter-observador [117].

Dado que los valores de captación de ^{18}FDG medido en las placas ateroscleróticas reflejan tanto la densidad como la actividad de los macrófagos [118], esta técnica se está empleando en aortas de conejos para valorar la respuesta terapéutica a diversos tratamientos en términos de actividad inflamatoria [119].

Tomografía axial computarizada para la cuantificación del score de calcio coronario

La detección y cuantificación de la presencia de aterosclerosis mediante TAC coronario por el método del Score de calcio es una técnica sencilla y reproducible [120]. La relación de la carga de calcio coronario con el pronóstico cardiovascular está bien establecida [121]. Esto se debe al hecho de que la cantidad de calcio es un marcador de enfermedad aterosclerótica que tiene una correlación directamente proporcional con la carga de placa [122]. Sin embargo, su utilidad para monitorizar los cambios en el perfil de riesgo cardiovascular es dudosa, puesto que, por ejemplo, el tratamiento con estatinas incrementa la presencia de calcio coronario. Este hallazgo se pone en relación con un posible efecto estabilizador de la aterosclerosis, al transformar placas lipídicas

vulnerables en placas fibrocálcicas estables [123]. Por otra parte, es una técnica que administra radiación ionizante y esto limita su uso en la población general sana.

La cuantificación de la calcificación de aorta en modelos animales de aterosclerosis está descrita. Sin embargo, la mayoría de estos estudios valoran la calcificación *ex vivo* tras haber extraído y fijado la aorta, por lo que se dispone de escasa información de cara a la adquisición de imágenes seriadas *in vivo*. Además, en el contexto de la experimentación animal, la validez de la tomografía computarizada convencional para la cuantificación del calcio vascular es incierta, ya que principalmente se usan aparatos de micro-tomografía axial computarizada que ofrecen una mayor resolución [124]. El modelo animal de aterosclerosis en conejo sirvió para estudiar la fiabilidad de la tomografía axial computarizada en la cuantificación del lumen y la caracterización del tipo de placa. Sin embargo, no hay datos sobre la eficacia de esta técnica en la cuantificación del volumen total de calcio para este modelo [125].

Ecografía

En los vasos de gran e intermedio calibre, y con adecuado acceso ecográfico, los ultrasonidos pueden detectar, cuantificar y caracterizar las placas según su tamaño, morfología e incluso su composición [126]. La presencia de placas de aterosclerosis y su caracterización en función de su espesor, área máxima y densidad acústica, se relaciona con eventos coronarios [127]. Sin embargo, se trata de una técnica observador dependiente y esto limita la extrapolación de los resultados de un centro a otro. Para reducir esta variabilidad inter-individual en la cuantificación del volumen de placa se ha desarrollado la ecografía vascular tridimensional [128].

En el modelo de aterosclerosis en conejo, el uso de la ecografía ha sido ampliamente empleado para la detección y cuantificación del volumen de placa en aorta. Además, el uso de ecopotenciadores permite estudiar la neovascularización de las placas [129].

Ultrasonidos intravasculares

La tecnología IVUS es una técnica invasiva que utiliza una sonda de ultrasonidos miniaturizada colocada en el extremo distal de un catéter. Mediante un sistema de rotación se adquieren imágenes que corresponden a la sección transversal del vaso adyacente a la sonda. Además, largos tramos de un vaso pueden ser analizados aplicando un mecanismo de retirada automático [130]. Múltiples estudios han validado la capacidad del IVUS para medir el volumen de la placa, la morfología y el lumen vascular. Además, los distintos componentes de la placa (tejido fibroso, calcio, lípidos) tienen una señal ecográfica diferente, por lo que su codificación permite la caracterización de la placa mediante “histología virtual” [131]. Por otra parte, el IVUS tiene alguna limitación más allá de la invasividad de la técnica. En concreto, la resolución axial y lateral es de 80 μm y 100-250 μm respectivamente, resultando por lo tanto una técnica inadecuada para la valoración del espesor de la capa fibrosa [132]. Además, el calcio bloquea la penetración de los ultrasonidos, produciendo sombras posteriores que limitan la cuantificación del volumen en placas calcificadas [133].

En el modelo animal de aterosclerosis en conejo se ha empleado el IVUS para caracterizar la tipología de placa desarrollada, para cuantificar la carga de placa y para medir el lumen vascular [134].

Tomografía de coherencia óptica

El OCT es una técnica invasiva que utiliza la luz infrarroja emitida por un transductor colocado en la punta de un catéter para generar imágenes de alta resolución. Similar al IVUS, mediante rotación del transductor y retirada automática se adquieren secuencias de secciones trasversales del vaso a lo largo de su recorrido. La resolución espacial es 10 veces mayor que la resolución IVUS (resolución axial de 10-20 μm y resolución lateral de 25 μm). Por esta razón, el OCT es la técnica de elección para detectar alteraciones de la íntima como trombos y erosiones o para cuantificar la capa fibrosa [135]. Otra ventaja del OCT es que el calcio no reduce la profundidad de la imagen adquirida. La principal limitación es que la luz infrarroja es atenuada por los lípidos, un fenómeno que limita el estudio volumétrico de las placas lipídicas. Otra limitación es que la sangre intraluminal bloquea la luz. Sin embargo, esto se soluciona mediante la inyección intracoronaria de contraste o suero durante la obtención de la imagen [130].

Durante la fase de planificación de este estudio, en la literatura científica no había experiencia sobre el empleo de OCT para el análisis de la aorta abdominal en el modelo de aterosclerosis en conejo. El conocimiento previo se limitaba al estudio *in vivo* de carótidas e ilíacas o al estudio *ex vivo* de la aorta abdominal, una vez extraída [136]. En paralelo a nuestro estudio, se publicaron otros que confirmaron la aplicabilidad de esta técnica en la evaluación de la aorta abdominal sin necesidad de extracción [137].

2. HIPÓTESIS

Planteamos que la colchicina tiene un efecto estabilizador sobre la placa aterosclerótica que se expresa mediante:

1. Regresión o limitación de la progresión de la placa.
2. Reducción de la infiltración macrofágica dentro de la placa.
3. Reducción o limitación de la activación macrofágica dentro de la placa.
4. Promoción de la transformación a placa fibrosa.
5. Aumento del espesor de la capa fibrosa de la placa.

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Aunque la investigación básica ha documentado varios posibles mecanismos celulares que apoyan el efecto beneficioso de la colchicina sobre la aterosclerosis, aún no están descritos los cambios macroscópicos que este fármaco provoca sobre la placa aterosclerótica *in vivo*.

El presente estudio fue diseñado para evaluar cómo la colchicina altera la evolución de la placa aterosclerótica. Para cumplir este propósito, fijamos los siguientes objetivos concretos:

1. Establecer *in vivo* el efecto modulador de la colchicina sobre la carga aterosclerótica mediante:

- valoración del efecto sobre el Índice de Pared Normalizado del vaso.

- valoración del efecto sobre el volumen de calcio vascular.

2. Establecer *in vivo* el efecto modulador de la colchicina sobre la actividad inflamatoria dentro de la placa aterosclerótica mediante:

- valoración de la infiltración macrofágica.

- valoración de la actividad macrofágica dentro del vaso.

3. Establecer *in vivo* el efecto modulador de la colchicina sobre la fibrosis dentro de la placa aterosclerótica mediante:

- valoración de la capa fibrosa.

- valoración de la proporción de placa lipídica respecto a la proporción de placa fibrosa.

4. Averiguar si los efectos de la colchicina dependen del perfil lipídico basal.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar nuestro objetivo se utilizó un modelo experimental de aterosclerosis en conejos y se realizó un amplio estudio de imagen en serie que incluyó imágenes de resonancia magnética (RM), tomografía por emisión de positrones con ^{18}F -fluorodeoxiglucosa integrada con tomografía computarizada (PET/TC con ^{18}F -FDG), tomografía de coherencia óptica (OCT) e inmunohistoquímica.

4.1 Diseño experimental

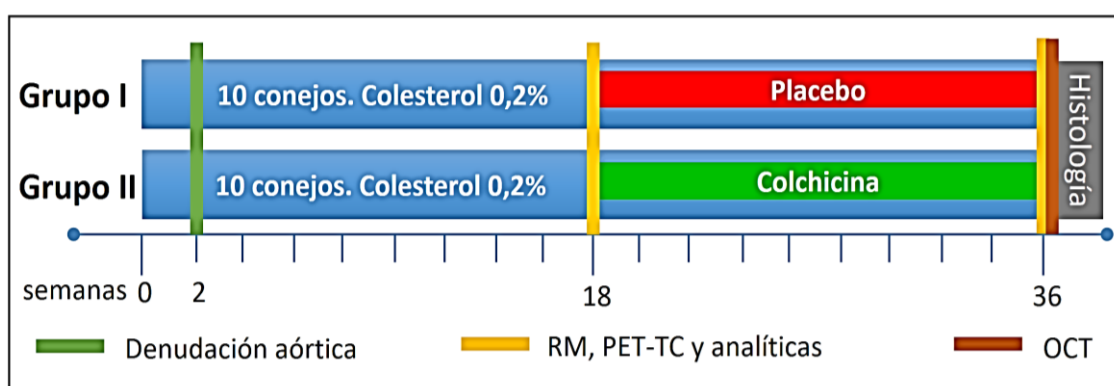


Figura 3. Diseño del estudio.

El esquema experimental se muestra en la Figura 3. Se indujo aterosclerosis aórtica en conejos macho de raza New Zealand White ($n = 20$, edad media = 3 meses, peso medio = 3.1 ± 0.3 kg, Charles River, L'arbresle Cedex, Francia). El protocolo del estudio duró 36 semanas, durante las cuales los animales fueron alimentados con una dieta aterogénica que contenía 0.2% de colesterol (LabDiet 5322, 0.2% de colesterol, TestDiet®, Londres, Reino Unido). Además, en la segunda semana se realizó la denudación endotelial de la aorta abdominal con balón utilizando catéteres Fogarty 4F introducidos a través de un acceso femoral (ver Figura 4). Este protocolo aterogénico se ha descrito detalladamente en estudios previos [138].

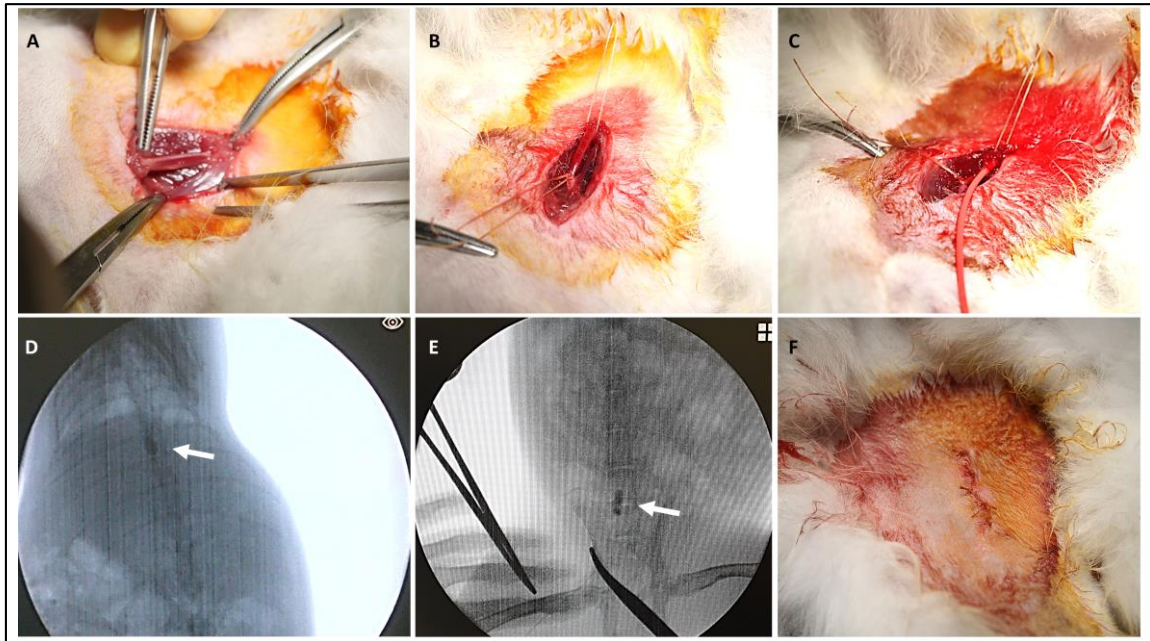


Figura 4. Procedimiento de denudación arterial con balón. A, En el plano profundo del triángulo femoral se localizan la arteria y vena femoral envueltas en la vaina femoral y el nervio femoral por fuera de ésta. *B*, Tras aislar la arteria femoral se procede a su ligadura distal. *C*, Se introduce el catéter Fogarty en la arteria femoral y se avanza de forma retrógrada hasta el diafragma. *D*, Se infla el globo. *E*, Se retrae el globo inflado hasta la bifurcación ilíaca. *F*, Tras la retirada del catéter se procede a la ligadura de la porción proximal de la arteria femoral y a la sutura de la herida quirúrgica.

Después de 18 semanas, los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos para recibir colchicina por vía subcutánea o solución salina por vía subcutánea, y se siguieron durante otras 18 semanas. Antes de la aleatorización a los grupos experimentales y también al final del estudio, todos los animales se sometieron a resonancia magnética y PET/TC con ^{18}F -FDG de la aorta abdominal. Los animales recibieron eutanasia con una sobredosis de pentobarbital. Inmediatamente después del sacrificio, las aortas fueron visualizadas por tomografía de coherencia óptica. Posteriormente, las aortas abdominales se extrajeron y se procesaron para el análisis histológico.

Para todas las técnicas, la arteria renal derecha sirvió como marcador anatómico de referencia y el análisis se centró en los 8 cm de aorta alrededor de ella (ver Figura 5).

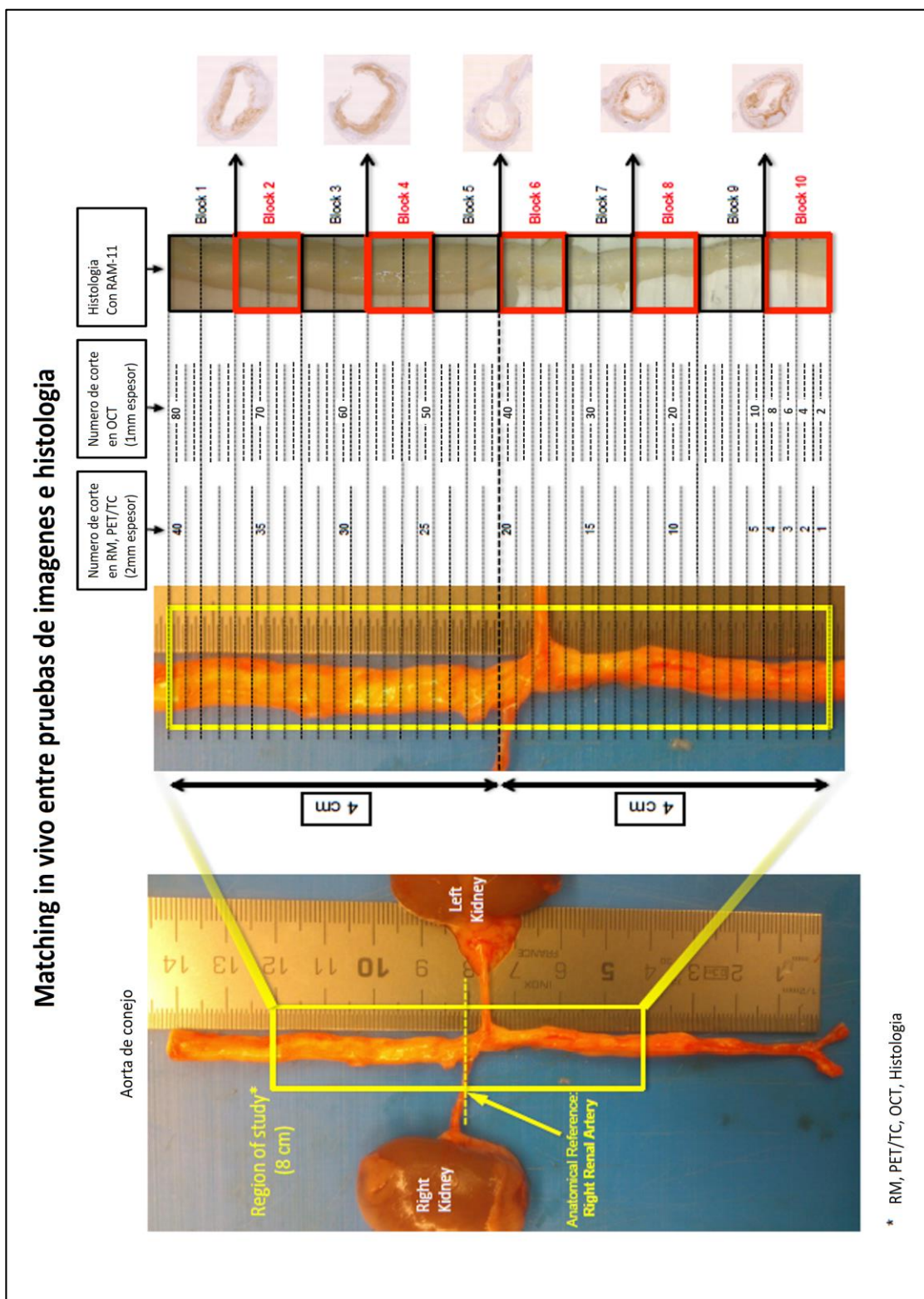


Figura 5. Correspondencia entre pruebas de imágenes y cortes histológicos. Con el rectángulo amarillo se evidencia el sector de aorta analizado en el estudio. Se muestran

los cortes de las diferentes técnicas de imagen y su correspondencia con los cortes histológicos.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Directiva Europea y la Legislación Española, y fue aprobado por el Comité de Ética Regional para la Experimentación con Animales. Los procedimientos se realizaron en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - CNIC que cumplen la normativa vigente relativa a bienestar animal (RD 53/2013 de 1 de febrero). Todos los investigadores implicados en el proyecto velaron por el cumplimiento de todas aquellas normas que competen al bienestar animal y todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo por personal acreditado para trabajar con animales de experimentación (categorías B, C y D según los requisitos del Orden ECC/566/2015).

4.2 Dosis y vía de administración

La dosis “cardioprotectora” empleada en los ensayos clínicos con población humana es de 0.5mg cada 12 horas por vía oral [43]. En experimentos traslacionales, según el modelo animal y las finalidades terapéuticas investigadas, se han usado diferentes dosis y vías de administración (transdérmica, subcutánea, intramuscular, oral, intraperitoneal e intravenosa) [139, 140]. En el único estudio previo con colchicina en un modelo de aterosclerosis en conejo con dieta hipercolesterolémica, sin denudación endotelial de la aorta con balón y sin control con placebo, se administraron 0.2mg/kg de colchicina por vía intraperitoneal 2 veces a la semana durante 3 semanas [62]. Cabe destacar que este modelo indujo cambios en el perfil lipídico de los conejos tratados con colchicina, lo cual sugiere que la vía de administración intraperitoneal pudo haber influido en la absorción de la grasa. En otro estudio, en el que se quiso evaluar la eficacia de la colchicina intramuscular a dosis crecientes (0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2 mg) en la

reducción de las adherencias peritoneales inducidas por *Neisseria Gonorrhoeae*, se documentó una regresión lineal positiva entre dosis y respuesta con un techo terapéutico a la dosis de 1mg [141].

Buscando el mayor confort posible para el animal, en nuestro estudio escogimos la vía subcutánea como vía de administración. Según el grupo al que fueron aleatorizados, los conejos recibieron colchicina a 0.2 mg/kg/día durante 5 días a la semana por vía subcutánea (Colchicine C3915, Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) o placebo, 1 ml de solución salina, 5 días a la semana por vía subcutánea.

4.3 Protocolo de imagen

4.3.1 Resonancia magnética

Antes de la obtención de imágenes, los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (10 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). La anestesia se mantuvo durante las sesiones de resonancia magnética con inhalación de isoflurano (1.2-1.5%) a través de una mascarilla facial. Las imágenes de RM se recogieron con un sistema de Resonancia Magnética 3 Tesla (Philips Health Care, Andover, MA, EEUU) y una bobina de rodilla convencional. Se obtuvieron 40 cortes axiales secuenciales de 2 mm de espesor, sin huecos, utilizando secuencias fast spin echo ponderadas en T2 (TR/TE 2300/62 ms) y en T1 (resolución 0.4 x 0.4 mm, TR/TE 1000/15 ms) para cada aorta. Un observador ciego al grupo de tratamiento trazó el lumen y la pared externa del vaso. El volumen de carga de la placa se definió como la suma del área de la pared del vaso en cada corte (área de la pared externa menos área del lumen) [142]. Los resultados se expresaron como Índice de Pared Normalizado (volumen de pared aórtica dividido por el volumen total del vaso).

4.3.2 PET/CT con ^{18}F -FDG

Las imágenes de PET con ^{18}F -FDG se obtuvieron de animales en ayunas 3 horas después de la inyección intravenosa de 111-148 MBq [3-4 mCi ($\sim 1 \text{ mCi/kg}$)] de ^{18}F -FDG, utilizando un escáner PET/TC combinado (Gemini TF 64, Philips Medical Systems). Antes de la obtención de las imágenes, los animales fueron anestesiados con ketamina/xilazina, tal y como se describió anteriormente, y se colocaron en posición prona con un soporte específico para animal en la parte superior de la camilla del escáner. Antes de la exploración PET se obtuvo una tomografía computarizada de baja dosis sin contraste (120 kV, 200 mA, tiempo de rotación de 0.5 s, colimación de 64 x 0.625 mm, índice de desplazamiento de 0.703, espesor de corte de 2 mm) para el registro anatómico y para la corrección de atenuación del dataset PET. Se adquirieron imágenes PET de toda la aorta incluyendo 3 posiciones de camilla con una superposición del 50% de la camilla (5 minutos por camilla) con el fin de asegurar una sensibilidad uniforme en la región de interés. Las imágenes resultantes fueron reconstruidas utilizando el algoritmo LOR-RAMLA implementado por el escáner. La matriz de imagen final contenía 174 cortes de 128 x 128 voxels, con 2.0 x 2.0 x 2.0 mm de tamaño de voxel, utilizando correcciones para normalización, tiempo muerto, atenuación, dispersión, coincidencias aleatorias, sensibilidad y decaimiento.

Para el análisis de imagen PET, las regiones circulares de interés (ROI) que abarcaban la pared del vaso se dibujaron manualmente en las imágenes de TC axial correspondientes que cubrían el tramo de 8 cm de la aorta abdominal y se centraron en la arteria renal derecha utilizando OsiriX Imaging Software (Pixmeo, Suiza). Los ROI se cuantificaron utilizando los valores estandarizados de captación (SUV). Se obtuvo el SUV máximo en cada ROI. Después se realizó el promedio de toda la arteria (meanSUVmax)

para cada animal. Además, utilizando las imágenes de tomografías computarizadas, se realizó una cuantificación de calcio midiendo el volumen de ROI con valores de Hounsfield Unit mayores de 65. Este resultado se expresó como volumen de calcio (mm^3) por animal.

4.3.3 Tomografía de coherencia óptica

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, la aorta torácica se canuló con dos catéteres de 16-Gauge. A continuación, a través de uno de los accesos, se insertó un catéter de adquisición de imágenes OCT (Dragonfly™ OPTIS™, St. Jude Medical, Minnesota, EEUU) hasta la aorta abdominal. Puesto que la sangre dispersa la luz y es fuente de artefactos, a través del acceso restante se administró una infusión continua de solución salina, desplazando así la sangre intravascular. Llegados a este punto, la aorta se escaneó con OCT mediante secuencias de retirada automática. De cada aorta, después de localizar la arteria renal derecha como punto medio, se analizaron 80 cortes axiales secuenciales, con una separación de 1 mm. Los cuadrantes de la aorta se clasificaron como pared normal, placa fibrosa o placa lipídica. Se midió el área luminal y el espesor de la capa fibrosa mínima para cada corte. Los resultados se expresaron como proporción de placa lipídica, promedio del área luminal y promedio del espesor de la capa fibrosa mínima.

4.3.4 Histología e inmunotinción:

Después de la sesión de imágenes OCT, la aorta se perfundió con solución salina tamponada con fosfato, se retiró suavemente y se fijó en formalina tamponada al 10%. El tramo de 8 cm que se estudió fue cortado en segmentos de 4 mm, marcado para

orientación e impregnado en parafina. Se obtuvieron secciones en serie de 4 μm de grosor que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Los macrófagos se identificaron en cortes adyacentes usando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra RAM-11, un marcador del citoplasma de macrófagos de conejo (dilución 1: 1000, Dako). Los resultados se expresaron como porcentaje de la superficie total de pared del vaso ocupada por macrófagos por animal.

4.4 Análisis de laboratorio

En el momento de la aleatorización y antes del sacrificio se extrajeron muestras de sangre a partir de la vena marginal de la oreja de cada animal en ayunas y se recogieron en tubos EDTA. Las muestras de sangre se centrifugaron (2000 x g durante 20 min a 4°C) y el plasma se almacenó en alícuotas a -80 ° C hasta el análisis. Se evaluaron los perfiles lipídicos.

4.5 Análisis estadístico

Cada resultado se presenta como mediana y rango intercuartílico (IQR). Las comparaciones estadísticas se hicieron usando la prueba U de Mann-Whitney para datos no apareados y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para datos apareados. Los valores de probabilidad <0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Los intervalos de confianza fueron calculados con el estimador de Hodges-Lehmann. Las distribuciones de los valores recogidos se muestran a través de los diagramas de cajas. Todos los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con SPSS 23.0 y GraphPad Prism 5, respectivamente.

El análisis inicial se realizó incluyendo la muestra total de cada grupo. Sucesivamente, se realizó un análisis de subgrupo dirigido a los conejos con el valor de

colesterol total pre-aleatorización superior al percentil 50 de cada grupo. Este análisis, no pre-especificado en la planificación inicial de nuestro estudio, fue incorporado a la luz de una reciente publicación preliminar que señaló que el efecto de la colchicina en el modelo de aterosclerosis en conejo podría ser más marcado en los sujetos con mayor dislipidemia [63].

5. RESULTADOS

5.1 Características animales y perfil lipídico:

La dieta aterogénica produjo dislipidemia grave en ambos grupos. A lo largo del estudio no hubo diferencias significativas entre los dos grupos en términos de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL y peso corporal (Tabla 3).

	Placebo	Colchicina	
	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>p</i>
Colesterol total			
<i>Pre (mg/dl)</i>	621 (433)	594 (254)	0.88
<i>Post (mg/dl)</i>	728 (405)	667 (450)	0.96
Colesterol LDL			
<i>Pre (mg/dl)</i>	620 (371)	622 (225)	0.99
<i>Post (mg/dl)</i>	721(487)	662 (423)	0.80
Colesterol HDL			
<i>Pre (mg/dl)</i>	186 (122)	236 (59)	0.65
<i>Post (mg/dl)</i>	153 (30)	187 (47)	0.13
Peso corporal			
<i>Pre (Kg)</i>	3.6 (0.7)	3.6 (0.5)	0.65
<i>Post (kg)</i>	3.5 (0.6)	3.8 (0.4)	0.13

Tabla 3. Perfil lipídico y peso corporal. IQR, rango intercuartil; Pre, previo a la aleatorización; Post, al final del protocolo.

Dos conejos murieron en la fase de pre-aleatorización por complicaciones vasculares secundarias al procedimiento de denudación arterial, mientras que un conejo de cada grupo murió en la fase posterior a la aleatorización sin haber sido posible definir la causa. La tasa de mortalidad hallada en nuestro estudio es similar a la descrita previamente para este modelo [143].

5.2 Características de la enfermedad aterosclerótica:

Se presentan inicialmente los resultados del análisis estadístico incluyendo toda la población del estudio (8 conejos en cada grupo) y, finalmente, se presentan los resultados del análisis aplicado al subgrupo de conejos con los niveles de colesterol total más altos (4 conejos en cada grupo).

5.2.1 Análisis de la carga de placa:

Durante la fase de tratamiento, el índice de pared normalizado de la aorta abdominal y el volumen de calcio aumentaron significativamente en ambos grupos. Entre los dos grupos, no se observaron diferencias en la progresión de la placa ni en el incremento relativo del índice de pared normalizado medido por RM [+12.0% (IQR 10.0%) en el grupo colchicina frente a +14.4% (IQR 10.1%) en el placebo $p=0.33$], ni en el aumento absoluto del volumen de calcio medido por TC [12.08 mm³ (IQR 13.94 mm³) en el grupo colchicina frente a 10.63 mm³ (IQR 32.19 mm³) en el placebo $p=0.96$]. Tampoco se observaron diferencias entre los dos grupos comparando los demás valores en el momento de la aleatorización y al final del protocolo (Ver Tabla 4 y Figura 6).

	Placebo	Colchicina	Colchicina vs Placebo	
	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Diferencia de la medianas (IC95%)</i>	<i>p</i>
Tamaño de la pared vascular en RM				
Pre NWI	0.43 (0.05)	0.42 (0.05)	-0.01 (-0.05 a 0.03)	0.57
Post NWI	0.50 (0.07)	0.48 (0.06)	-0.02 (-0.08 a 0.06)	0.28
Cambio absoluto	0.06 (0.04)	0.05 (0.04)	-0.01 (-0.05 a 0.02)	0.38
Cambio relativo, %	14.4 (10.1)	12.0 (10.0)	-2.6 (-11.2 a 4.2)	0.33
Volumen de calcio vascular en TC				
Pre Volumen de calcio, mm ³	2.34 (5.63)	0.86 (3.61)	0.62 (-5.49 a 1.59)	0.46
Post Volumen de calcio, mm ³	10.38 (36.15)	13.35 (8.03)	1.85 (-9.89 a 29.91)	0.65
Cambio absoluto, mm ³	10.63 (32.19)	12.08 (13.94)	1.97 (-10.99 a 24.50)	0.96

Tabla 4. Carga de placa. IQR, rango intercuartil; NWI, Índice de pared normalizado; Pre, previo a la aleatorización; Post, al final del protocolo; CI95%, 95% Intervalo de confianza.

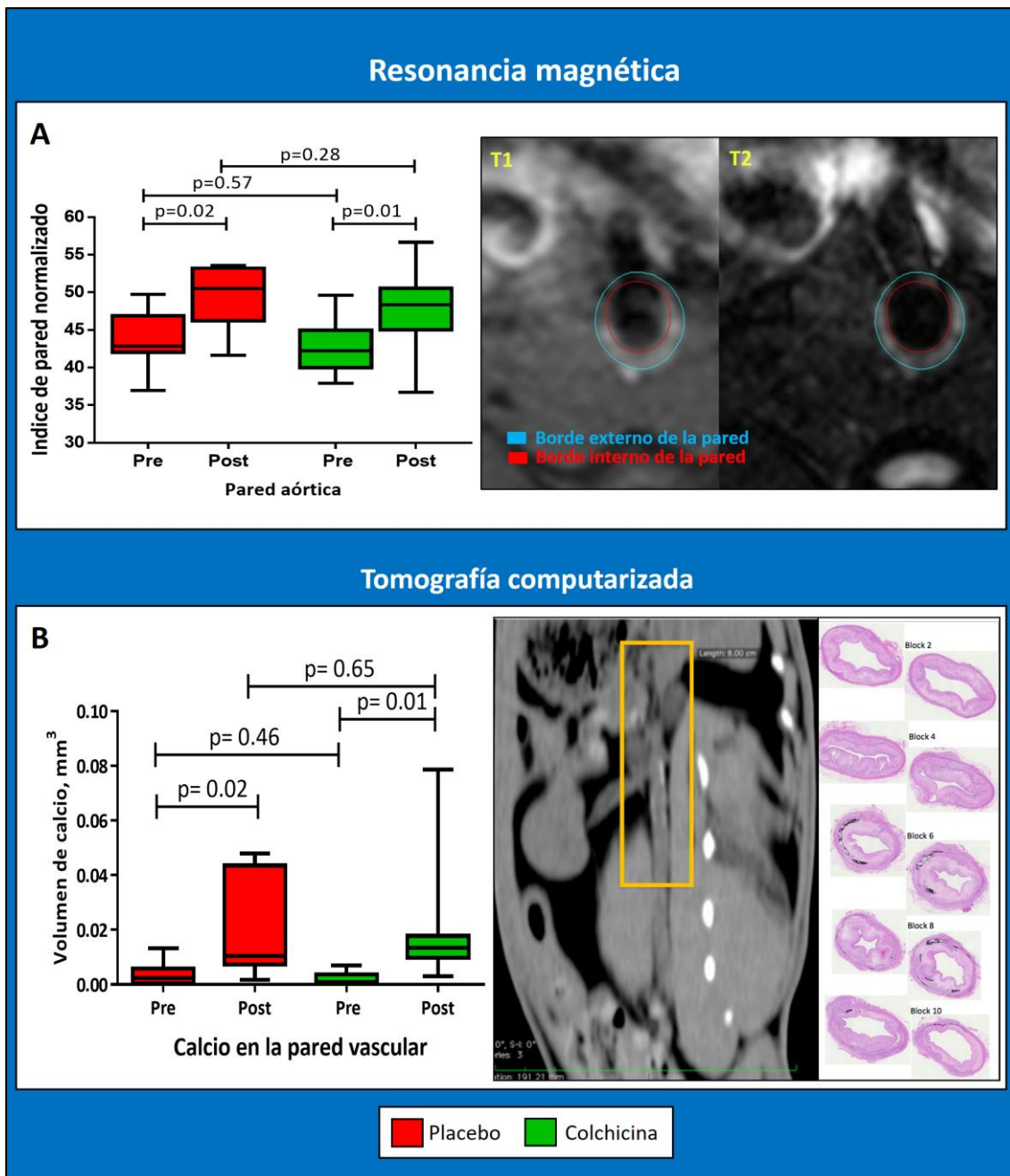


Figura 6. Carga de placa. A, Resonancia magnética. A la izquierda, la distribución de los valores de índice de pared normalizado y las comparaciones de los grupos se muestran mediante diagramas de cajas. A la derecha, un ejemplo de imágenes spin-eco ponderadas en T1 y T2 del mismo corte de aorta abdominal muestra la medición de la pared arterial. **B**, Cuantificación de calcio por tomografía computarizada. A la izquierda, la distribución de los valores absolutos del volumen de calcio y las comparaciones entre grupos se muestran mediante diagramas de cajas. A la derecha, vista coronal de la aorta abdominal mostrando manchas de alta señal a lo largo del vaso. La tinción histológica confirmó la capacidad de detectar calcificaciones. La caja amarilla delimita los 8 cm de aorta abdominal evaluados por el estudio. Pre, antes de la aleatorización; Post, al final del protocolo.

5.2.2 Análisis de la inflamación vascular:

^{18}F -FDG disminuyó en el grupo de colchicina, mientras que aumentó en el grupo placebo, con una tendencia hacia la significación [-10.9% (IQR 32.1%) en el grupo colchicina frente a + 13.7% (IQR 48.6%) en el placebo; $p = 0.13$]. No se observaron diferencias en el área de la pared aórtica ocupada por macrófagos marcados por inmuno-tinción con RAM-11 [16.6% (IQR 19.2%) en el grupo de colchicina versus 24.0% (IQR 31.1 %) en el placebo; $P = 0.77$] (Ver Tabla 5 y Figura 7).

	Placebo	Colchicina	Colchicina vs Placebo	
	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Diferencia de la medianas (IC95%)</i>	<i>p</i>
Captación ^{18}F-FDG en PET/CT				
Pre meanSUVmax	0.72 (0.23)	0.79 (0.44)	0.04 (-0.14 a 0.34)	0.57
Post meanSUVmax	0.85 (0.19)	0.72 (0.17)	-0.09 (-0.21 a 0.05)	0.13
Cambio absoluto	0.07 (0.33)	- 0.02 (0.24)	-0.13 (-0.38 a 0.09)	0.20
Cambio relativo, %	13.7 (48.6)	- 10.9 (32.1)	-16.3 (-55.3 a 7.6)	0.13
Infiltración de macrófagos en Histología				
RAM-11, %	24.0 (31.1)	16.6 (19.2)	-3.0 (-19.2 a 8.6)	0.72

Tabla 5. Inflamación vascular. IQR, rango intercuartil; meanSUVmax, promedio de la captación máxima estandarizada; RAM-11, porcentaje del vaso marcada por la inmuno-tinción con RAM-11; Pre, previo a la aleatorización; Post, al final del protocolo; CI95%, 95% Intervalo de confianza.

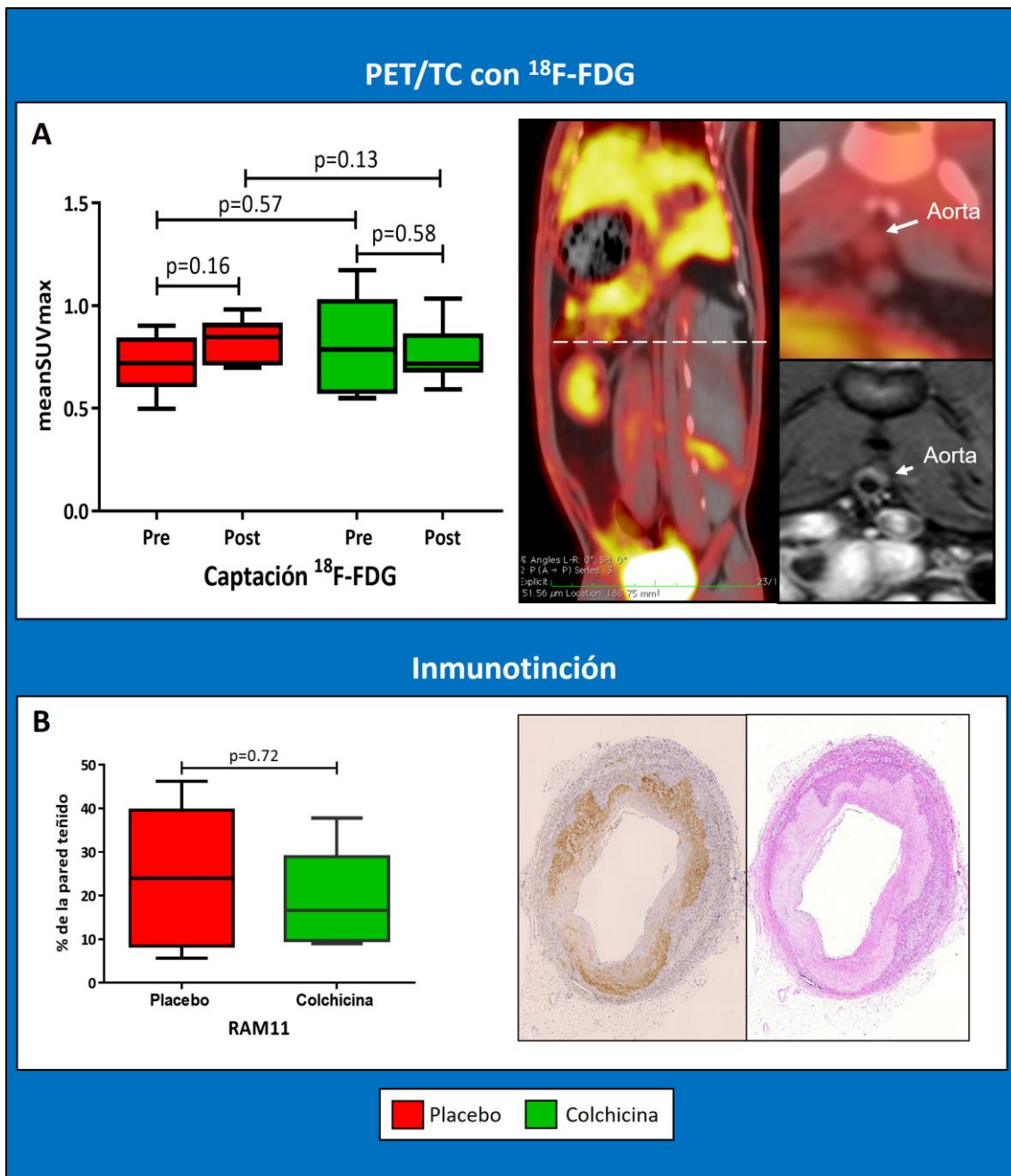


Figura 7. Inflamación vascular. **A**, PET/TC con ^{18}F -FDG. A la izquierda, la distribución de los valores de captación de ^{18}F -FDG y la comparación de grupos se muestran mediante diagramas de cajas. A la derecha, tomografía combinada de PET/TC de la aorta abdominal *in vivo* que ilustra la captación de ^{18}F -FDG. Al lado, se muestra la vista axial del corte indicado con una línea punteada en la vista coronal: arriba, la imagen de PET/TC muestra una captación aumentada de FDG en la aorta y, abajo, la correspondiente imagen de resonancia magnética ponderada en T1 evidencia el desarrollo de la lesión aterosclerótica con un aumento del espesor de pared del vaso. **B**, Inmuno-tinción de macrófagos. La distribución de los valores de porcentaje de la superficie total de la pared vascular ocupada por macrófagos y la comparación de los grupos se muestran mediante diagramas de cajas. A la derecha, dos cortes axiales

adyacentes teñidos con anticuerpo RAM-11 y hematoxilina-eosina, respectivamente. Pre, antes de la aleatorización; Post, al final del protocolo.

5.2.3 Tipología de la placa:

El análisis de las aortas por OCT no encontró diferencias en la tipología de las placas ateroscleróticas [94% (IQR 8%) de la aorta con placa lipídica en el grupo colchicina versus 93% (IQR 9%) en el grupo placebo, $p=0.88$], en el área luminal mínima [6.6 mm² (IQR 3.3 mm²) en el grupo colchicina versus 5.2 mm² (IQR 2.5 mm²) en el grupo placebo, $p=0.44$], ni en el espesor de la capa fibrosa mínima [119.1 µm (IQR 37.1 µm) en el grupo colchicina versus 113.0 µm (IQR 24.5 µm) en el grupo placebo, $p=0.88$] (Ver Tabla 6 y Figura 8).

	Placebo	Colchicina	Colchicina vs Placebo	
	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Diferencia de la mediana (IC95%)	<i>p</i>
OCT				
Proporción de placa lipídica	0.93 (0.09)	0.94 (0.08)	0.00 (-0.07 a 0.07)	0.88
Área luminal, mm ²	5.2 (2.5)	6.6 (3.3)	1,16 (-2.97 a 3.19)	0.44
Capa fibrosa mínima, µm	113.0 (24.5)	119.1 (37.1)	1.24 (-1.41 a 24.20)	0.88

Tabla 6. Tipología de placa por tomografía de coherencia óptica. IQR, rango intercuartil; Pre, previo a la aleatorización; Post, al final del protocolo; CI95%, 95% Intervalo de confianza.

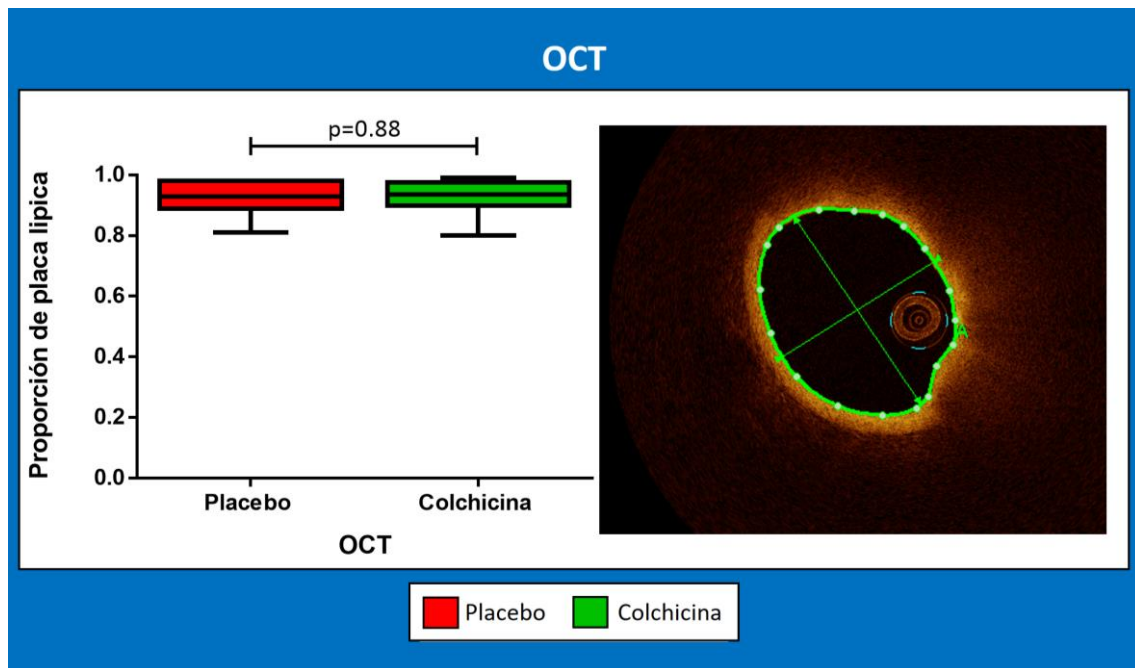


Figura 8. Tipología de placa por tomografía de coherencia óptica. A la izquierda, la distribución de los valores medios de proporción de placa lipídica en cada grupo se muestra mediante diagramas de cajas. Se presenta el resultado de la comparación de los grupos. A la derecha, un corte axial de la una placa lipídica.

5.2.4 Análisis de subgrupo en los conejos con los niveles de colesterol total más altos:

Los dos grupos no mostraron diferencias ni en el perfil lipídico ni en el peso corporal durante el estudio. El análisis de la pared aórtica por RM evidenció diferencias significativas en los valores de índice de pared normalizado al final del protocolo a favor de colchicina [0.47 (IQR 0.03) en el grupo colchicina frente a 0.52 (IQR 0.04) en el placebo $p=0.029$]. También se encontraron diferencias a favor de la colchicina en términos de captación de ^{18}F FDG al final del estudio [0.72 (IQR 0.06) en el grupo colchicina frente a 0.90 (IQR 0.09) en el placebo $p=0.029$]. Además, mientras el grupo colchicina no evidenció diferencias en el análisis de ^{18}F FDG durante las diferentes fases del estudio,

el grupo placebo sí mostró un incremento de la captación que rozó la significación estadística (Ver Figura 9). No hubo otras diferencias en las demás variables del estudio.

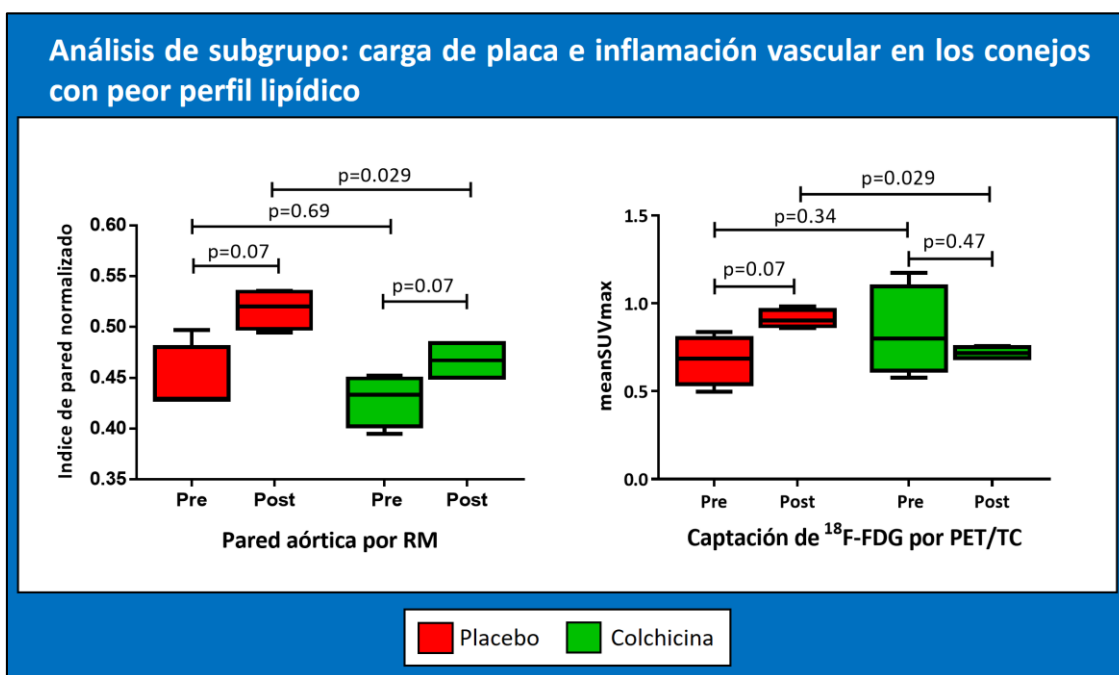


Figura 9. Análisis de subgrupo: carga de placa e inflamación vascular en los conejos con niveles de colesterol total más altos. A la izquierda, se muestra mediante diagramas de caja la distribución de los valores de índice de pared normalizado de cada grupo en las diferentes fases del estudio. A la derecha, se muestra mediante diagramas de cajas la distribución de los valores de captación de ¹⁸F-FDG de cada grupo en las diferentes fases del estudio. Se presentan las significaciones estadísticas de las comparaciones entre los grupos.

6. DISCUSIÓN

En pacientes con enfermedad arterial coronaria estable, la colchicina ha mostrado efectos prometedores en la prevención secundaria de eventos coronarios isquémicos [43]. Sin embargo, los mecanismos por los cuales este fármaco podría modular el proceso aterosclerótico *in vivo* son desconocidos. Al día de hoy, éste es el primer estudio que evalúa la progresión de la aterosclerosis bajo tratamiento con colchicina en un modelo animal de placa vulnerable y mediante una combinación de imagen multimodal *in vivo* que incluye RM, ¹⁸F-FDG PET/TC, OCT e inmunohistología.

6.1 De placa vulnerable a vulnerabilidad del árbol coronario:

El término "placa vulnerable" se utiliza para definir a aquellas placas susceptibles de generar complicaciones trombóticas. Clásicamente, las características morfológicas comunes propuestas para la placa vulnerable son: un gran núcleo rico en lípidos, marcada infiltración de macrófagos, una capa fibrosa fina, un remodelado expansivo y un gran tamaño de placa [136, 144]. Sin embargo, a pesar de la capacidad para identificar lesiones ateroscleróticas que exhiban estas características vulnerables, el estudio de imagen enfocado en la localización de placas individuales con características de vulnerabilidad no ha conseguido demostrar una utilidad clínica en la prevención de eventos isquémicos[145]. Este resultado negativo se debe al hecho de que la mayoría de las placas vulnerables se rompen sin producir un síndrome clínico [146]. En este sentido, varios estudios de imágenes longitudinales han demostrado que la morfología de la placa cambia a lo largo de los meses, ganando o perdiendo características de vulnerabilidad [147]. De hecho, hasta el 75% de las placas con características de vulnerabilidad se transforman en placas fibrosas de espesor grueso dentro de un intervalo de 12 meses, presumiblemente en relación con un proceso de rotura subclínica y sucesiva cicatrización [148].

Publicaciones recientes sobre vulnerabilidad reiteran la importancia de ir más allá del concepto de placa vulnerable [149], puesto que la detección de un estado de vulnerabilidad en un paciente tiene mayor impacto que la detección de sitios individuales de vulnerabilidad [147]. Evaluando el árbol arterial en su conjunto, los predictores más fuertes de eventos isquémicos resultan ser la carga total de la placa y la actividad inflamatoria a lo largo de todo el vaso.

6.2 Carga total de placa:

El índice de pared normalizado evaluado por resonancia magnética y el volumen de calcio medido por TC son enfoques validados para la cuantificación de la carga total de placa aterosclerótica [150, 151].

En el análisis general de nuestro estudio, ambas variables mostraron un aumento significativo compatible con progresión de la enfermedad aterosclerótica en los dos grupos. Sin embargo, el análisis dirigido a la población de conejos que desarrolló mayor dislipidemia, detectó un menor índice de pared normalizado al final del estudio en el grupo que recibió colchicina. Este resultado, favorable para el grupo colchicina, es consistente con los resultados preliminares de un estudio presentado recientemente en el Congreso Europeo de Cardiología de 2015. En concreto, el póster remarcó que el efecto beneficioso de colchicina sobre el remodelado vascular de conejos alimentado con dieta aterogénica es más marcado en los sujetos con el nivel de colesterol más alto [63].

Nuestro modelo de inducción de aterosclerosis se basa en la dieta aterogénica y en la denudación endotelial con balón. El menor crecimiento de la pared del vaso tras una lesión traumática con balón observado en nuestro estudio es consistente con los

datos descritos previamente. En concreto, ya había sido descrito que la colchicina reduce la reestenosis en pacientes diabéticos con implante de stent convencionales y la hiperplasia endotelial en un modelo de angioplastia en perro.

Para evaluar la ausencia de diferencias en la calcificación vascular detectada por TC hay que tener en cuenta la limitación de esta técnica para diferenciar la calcificación secundaria a la progresión de la enfermedad de aquella secundaria a la estabilización de la placa aterosclerótica. De hecho, la utilidad del TC para monitorizar los cambios en el riesgo cardiovascular en respuesta a un tratamiento farmacológico es discutible, puesto que el tratamiento intensivo con estatinas, a pesar de reducir la progresión de la enfermedad, incrementa la presencia de calcio coronario. Este incremento se debe al efecto estabilizador del fármaco sobre la aterosclerosis, ya que aumenta la proporción fibrocálcica de las placas coronarias y por lo tanto reduce su riesgo de rotura [123]. Por otra parte, el hecho de que el análisis histológico haya coincidido con la detección de calcio por TC, apoya el hecho de que la detección de calcio por TC en este modelo animal es fiable.

6.3 Actividad inflamatoria:

La actividad inflamatoria dentro del vaso aterosclerótico expresa una enfermedad activa con mayor riesgo de complicaciones. Esta actividad se puede demostrar *in vivo* por imágenes PET con ^{18}F -FDG y *ex vivo* por la infiltración de macrófagos [152]. Además, se ha evidenciado que la respuesta a los fármacos cardiovasculares se puede evaluar en función los cambios de la captación de ^{18}F -FDG en el seguimiento [153].

Cabe destacar que ya en el análisis general de nuestro estudio se observó una tendencia divergente de la actividad inflamatoria estimada mediante captación de ^{18}F -FDG. Estas diferencias se vuelven significativas cuando el análisis estadístico se enfoca a los conejos con mayor dislipidemia. En concreto, en este análisis de subgrupo se aprecia un aumento de la captación de ^{18}F -FDG en el grupo placebo y una estabilización de la captación en el grupo colchicina, presentando los dos grupos diferencias significativas al final del estudio. Por otra parte, la densidad histológica de macrófagos marcados mediante la tinción de RAM-11 mostró una mínima diferencia estadísticamente no relevante. Los estudios de ciencia básica sugieren que el efecto antiinflamatorio de la colchicina se desarrolla mediante dos procesos: la inhibición de la infiltración leucocitaria por un lado y la inhibición de la activación macrofágica por el otro. La discrepancia observada en nuestro estudio entre la actividad inflamatoria y la infiltración de macrófagos podría explicarse por la limitación del modelo animal. El efecto traumático de la lesión con globo puede haber producido una marcada infiltración de macrófagos previa al tratamiento con colchicina. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que en un modelo de aterosclerosis en conejo basado en una dieta rica en colesterol sin denudación endotelial sí se documentaron diferencias estadísticamente significativas a favor de colchicina, usando en dicho estudio la misma tinción contra RAM11 que la empleada en el nuestro. Además, la evaluación de la infiltración de los macrófagos por histología no permite evaluar el cambio entre el momento de la aleatorización y el final del protocolo, puesto que este dato se puede recoger únicamente al finalizar del estudio. En la aterosclerosis no traumática, como ocurre en el ser humano, la colchicina podría tener un efecto sobre la permeabilidad endotelial a los leucocitos más relevante de lo documentado en nuestro estudio.

6.4 Tipología de placa:

La tomografía de coherencia óptica intravascular proporciona *in situ* imágenes transversales de alta resolución y permite la caracterización de la placa *in vivo* [154]. Los resultados de estudios anatómo-patológicos en pacientes con infartos han propuesto un espesor de capa fibrosa menor de 65 μm como criterio de vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. Sin embargo, este umbral puede ser mayor cuando se evalúa *in vivo* la placa, dado que la fijación histológica implica un proceso de deshidratación [155]. Por lo tanto no debe extrañar el espesor mínimo detectado en nuestro experimento.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a la proporción de placas lipídicas, el área luminal y el espesor mínimo de capa fibrosa, tampoco en el análisis general ni en el análisis de subgrupo. Por otra parte, nuestros resultados confirman que nuestro modelo animal es válido para el estudio de la aterosclerosis coronaria, puesto que se detectó una alta prevalencia de placas lipídicas con área luminal y un espesor de capa fibrosa similar a las de la enfermedad coronaria aterosclerótica humana.

6.5 Efectos de colesterol sobre la eficacia de la colchicina:

Los efectos de la colchicina sobre la aterosclerosis en un modelo animal *in vivo* han sido explorados en dos estudios: en el nuestro y en el de Merlet et al. Ambos estudios, basados en el modelo animal de aterosclerosis en conejo, evidencian mayores diferencias entre los grupos experimentales cuando se analizan los sujetos con los niveles de colesterol total más altos. Este fenómeno podría explicarse por dos razones. Por un lado, este hallazgo podría depender del hecho de que los conejos con la mayor dislipemia desarrollan la aterosclerosis más activa y, por lo tanto, representarían el subgrupo donde se esperaría la mayor diferencia en caso de respuesta al tratamiento.

Por otro, la mayor eficacia de la colchicina en este subgrupo podría deberse al hecho de que en esta subpoblación la colchicina desempeñaría su mayor eficacia.

La acumulación de colesterol en las placas ateroscleróticas puede dar lugar a la formación de cristales de colesterol que se pueden encontrar en todas las etapas de la aterogénesis [156]. Se ha demostrado que estos cristales pueden ser fagocitados por macrófagos y que, en abundantes cantidades, inducen un daño lisosómico que da lugar a la activación del inflamosoma NLRP3, con posterior activación de la caspasa-1 y secreción de las citoquinas proinflamatorias de la familia IL-1 β [157]. Aunque nuestro estudio no haya analizado si los conejos con mayor nivel de colesterol son también los que han desarrollado mayor cantidad de cristales de colesterol, podemos especular que, a mayor nivel de colesterol total en sangre, mayor probabilidad de formación de cristales de colesterol en la placa aterosclerótica y, consecuentemente, mayor activación del inflamosoma NLRP3. Previamente, ha sido demostrado que la colchicina reduce el ensamblaje de inflamosoma NLRP3 y la producción IL-1 β inducida por cristales de colesterol. Por lo tanto, las diferencias observadas entre los dos grupos podrían ser secundarias a la eficacia de la colchicina al inhibir la activación inflamatoria inducida por los cristales de colesterol. Esto concordaría con la menor captación de ^{18}F -FDG observada en el grupo tratado.

6.6 Limitaciones

A parte de las ya descritas, nuestro estudio tiene otras limitaciones. Actualmente, el tratamiento de la enfermedad coronaria sigue una estrategia polifarmacológica con un efecto sinérgico sobre la enfermedad. Sin embargo, nuestro estudio se desarrolló en un escenario monofarmacológico. Esto podría haber limitado el

efecto de la colchicina en comparación con lo que se ha observado en los ensayos clínicos recientes. De hecho, entre los efectos beneficiosos de las estatinas se reconoce su capacidad para limitar la formación de cristales de colesterol [158]. La reducción de la formación de cristales de colesterol, junto con la capacidad de la colchicina de inhibir la activación del inflamosoma NLRP3, representaría un mecanismo sinérgico en el control de la inflamación dentro de la placa aterosclerótica. Además, la combinación con el ácido acetilsalicílico, que posee propiedades antiinflamatorias a parte de antiagregantes, podría desempeñar un efecto sinérgico que tampoco ha sido explorado en nuestro estudio.

Por otra parte, el número reducido de sujetos en cada grupo puede haber influido en la potencia del estudio. La tendencia divergente observada en la captación de ^{18}F -FDG hubiera, tal vez, podido alcanzar la significación estadística en una muestra de mayor tamaño. Sin embargo, cabe destacar que la muestra empleada y el tiempo de desarrollo del estudio están en línea con el promedio de sujetos empleados en otros estudios.

Aunque se haya podido observar una estabilización de la actividad inflamatoria en el subgrupo de conejos con el perfil de colesterol más aterogénico, el diseño del estudio no ha podido definir el mecanismo por el cual *in vivo* la colchicina puede modular la respuesta inflamatoria vascular.

El análisis de subgrupo no fue pre-especificado en el momento del diseño del estudio. Esto se debe al hecho de que durante la realización del estudio fueron publicados resultados *in vivo* que demostraban una mayor eficacia de la colchicina en

los sujetos con mayor dislipidemia. Puesto que estos resultados fueron obtenidos en un modelo similar al nuestro, finalmente se decidió incluir este subanálisis en el estudio.

6.7 Próximas investigaciones sobre el papel de la colchicina como modulador de la aterosclerosis:

El estudio de los efectos de la colchicina sobre la placa aterosclerótica tiene un largo recorrido y los resultados de nuestro estudio son consistentes con el conocimiento previo. De cara a conseguir un resultado clínico definitivo, está actualmente en fase de reclutamiento el estudio LoDoCo 2, un estudio multicéntrico doble ciego y controlado con placebo en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. Se debería incluir un análisis de subgrupo estratificado según los niveles de colesterol total.

Futuros estudios en modelos animales deberían explorar el posible papel de la colchicina en la limitación del desarrollo de cristales de colesterol, así como el posible efecto sinérgico de la colchicina en combinación con otros fármacos de uso común en el manejo del paciente con cardiopatía isquémica.

7. CONCLUSIONES

En respuesta a los objetivos propuestos para evaluar los efectos de la colchicina sobre la placa aterosclerótica, las conclusiones de esta tesis son:

1. la colchicina podría desempeñar *in vivo* un efecto modulador sobre la carga aterosclerótica. Sin embargo, en nuestro estudio este efecto se hace evidente sólo en concomitancia con los niveles de colesterol total más altos. La colchicina no influye sobre de la calcificación del vaso.
2. la colchicina podría desempeñar *in vivo* un efecto estabilizador sobre la actividad inflamatoria vascular. En concreto, nuestros resultados sugieren una menor activación de los macrófagos sin reducir su reclutamiento parietal. Este efecto parece depender del perfil lipídico subyacente, resultando más marcado en concomitancia con los niveles de colesterol total más altos.
3. la colchicina no influye en la evolución de la enfermedad aterosclerótica hacia placas fibrosas ni en el espesor de la capa fibrosa mínima.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Herrington, W., et al., *Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 535-46.
2. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. **385**(9963): p. 117-71.
3. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
4. Collins, T. and M.I. Cybulsky, *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 255-64.
5. Tousoulis, D., et al., *Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches*. Eur Heart J, 2016. **37**(22): p. 1723-32.
6. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
7. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(2): p. 77-86.
8. Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, *Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1506-16.
9. Gonzalez-Quesada, C. and N.G. Frangogiannis, *Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes*. Curr Atheroscler Rep, 2009. **11**(2): p. 131-8.
10. Charo, I.F. and M.B. Taubman, *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease*. Circ Res, 2004. **95**(9): p. 858-66.
11. Kzhyshkowska, J., C. Neyen, and S. Gordon, *Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis*. Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 492-502.
12. Clinton, S.K., et al., *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 301-16.
13. Rosenfeld, M.E., et al., *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 291-300.

14. Libby, P., *The vascular biology of atherosclerosis*. Book chapter from Braunwald's heart disease. Ninth Edition., 2012.
15. Lichtman, A.H., *Adaptive immunity and atherosclerosis: mouse tales in the AJP*. Am J Pathol, 2013. **182**(1): p. 5-9.
16. Lichtman, A.H., et al., *Adaptive immunity in atherogenesis: new insights and therapeutic approaches*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 27-36.
17. Ait-Oufella, H., et al., *Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(1): p. 23-33.
18. Taleb, S., A. Tedgui, and Z. Mallat, *Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis*. J Intern Med, 2008. **263**(5): p. 489-99.
19. Manabe, I. and R. Nagai, *Regulation of smooth muscle phenotype*. Curr Atheroscler Rep, 2003. **5**(3): p. 214-22.
20. Kavurma, M.M., N.Y. Tan, and M.R. Bennett, *Death receptors and their ligands in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(10): p. 1694-702.
21. Dollery, C.M. and P. Libby, *Atherosclerosis and proteinase activation*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 625-35.
22. Sharma, R. and J. Katz, *Preliminary studies on human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism, matrix metalloprotease-9, apoptosis, and carotid atherosclerosis plaque size by proton magnetic resonance imaging*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2010. **11**(3): p. 198-204.
23. Sukhova, G.K., et al., *Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques*. Circulation, 1999. **99**(19): p. 2503-9.
24. Abbate, A., et al., *Sudden coronary death, fatal acute myocardial infarction and widespread coronary and myocardial inflammation*. Heart, 2008. **94**(6): p. 737-42.
25. Ridker, P.M., *Inflammation, C-reactive protein, and cardiovascular disease: moving past the marker versus mediator debate*. Circ Res, 2014. **114**(4): p. 594-5.
26. Lagrand, W.K., et al., *C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?* Circulation, 1999. **100**(1): p. 96-102.

27. Peters, M.J., et al., *Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study.* Arthritis Rheum, 2009. **61**(11): p. 1571-9.
28. Healy, A.M., et al., *Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events.* Circulation, 2006. **113**(19): p. 2278-84.
29. Mizuno, Y., R.F. Jacob, and R.P. Mason, *Inflammation and the development of atherosclerosis.* J Atheroscler Thromb, 2011. **18**(5): p. 351-8.
30. Kisiel, B., et al., *Methotrexate, Cyclosporine A, and Biologics Protect against Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis.* J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 759610.
31. Barnabe, C., B.J. Martin, and W.A. Ghali, *Systematic review and meta-analysis: anti-tumor necrosis factor alpha therapy and cardiovascular events in rheumatoid arthritis.* Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. **63**(4): p. 522-9.
32. Moreno, P.R. and A. Kini, *Resolution of inflammation, statins, and plaque regression.* JACC Cardiovasc Imaging, 2012. **5**(2): p. 178-81.
33. Ikonomidis, I., et al., *Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin.* Circulation, 1999. **100**(8): p. 793-8.
34. Hitzeman, N. and R. Stephens, *Colchicine for acute gout.* Am Fam Physician, 2015. **91**(11): p. 759-60.
35. Portincasa, P., *Colchicine, Biologic Agents and More for the Treatment of Familial Mediterranean Fever. The Old, the New, and the Rare.* Curr Med Chem, 2016. **23**(1): p. 60-86.
36. Imazio, M. and A. Brucato, *[ESC guidelines for the diagnosis and management of pericardial disease: what should change in our clinical approach?].* G Ital Cardiol (Rome), 2015. **16**(12): p. 672-4.
37. Deftereos, S., et al., *Colchicine for prevention of atrial fibrillation recurrence after pulmonary vein isolation: mid-term efficacy and effect on quality of life.* Heart Rhythm, 2014. **11**(4): p. 620-8.
38. Langevitz, P., et al., *Prevalence of ischemic heart disease in patients with familial Mediterranean fever.* Isr Med Assoc J, 2001. **3**(1): p. 9-12.

39. Kukuy, O., et al., *Normal arterial stiffness in familial Mediterranean fever: evidence for a possible cardiovascular protective role of colchicine*. Clin Exp Rheumatol, 2017.
40. Crittenden, D.B., et al., *Colchicine use is associated with decreased prevalence of myocardial infarction in patients with gout*. J Rheumatol, 2012. **39**(7): p. 1458-64.
41. Solomon, D.H., et al., *Effects of colchicine on risk of cardiovascular events and mortality among patients with gout: a cohort study using electronic medical records linked with Medicare claims*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(9): p. 1674-9.
42. Nidorf, M. and P.L. Thompson, *Effect of colchicine (0.5 mg twice daily) on high-sensitivity C-reactive protein independent of aspirin and atorvastatin in patients with stable coronary artery disease*. Am J Cardiol, 2007. **99**(6): p. 805-7.
43. Nidorf, S.M., et al., *Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(4): p. 404-10.
44. Devereux, S., et al., *Colchicine treatment for the prevention of bare-metal stent restenosis in diabetic patients*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(16): p. 1679-85.
45. Leung, Y.Y., L.L. Yao Hui, and V.B. Kraus, *Colchicine--Update on mechanisms of action and therapeutic uses*. Semin Arthritis Rheum, 2015. **45**(3): p. 341-50.
46. Back, M. and G.K. Hansson, *Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(4): p. 199-211.
47. Nidorf, S.M., J.W. Eikelboom, and P.L. Thompson, *Colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease*. Curr Atheroscler Rep, 2014. **16**(3): p. 391.
48. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
49. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
50. Chia, E.W., R. Grainger, and J.L. Harper, *Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis: a rationale for use of low-dose colchicine*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(6): p. 1288-95.

51. Nuki, G., *Colchicine: its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation*. Curr Rheumatol Rep, 2008. **10**(3): p. 218-27.
52. Mamdouh, Z., G.E. Kreitzer, and W.A. Muller, *Leukocyte transmigration requires kinesin-mediated microtubule-dependent membrane trafficking from the lateral border recycling compartment*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 951-66.
53. Cronstein, B.N., et al., *Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 994-1002.
54. Asako, H., et al., *Colchicine and methotrexate reduce leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules*. Inflammation, 1992. **16**(1): p. 45-56.
55. Netsky, M.G., T.B. Clarkson, and D. Stokes, *The experimental production of arteriosclerosis: response of the avian artery to intramural cholesterol and other insoluble substances*. Am J Pathol, 1959. **35**: p. 1081-9.
56. Suhalim, J.L., et al., *Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy*. Biophys J, 2012. **102**(8): p. 1988-95.
57. Frink, R.J., *Parallel cholesterol crystals: a sign of impending plaque rupture?* J Invasive Cardiol, 2010. **22**(9): p. 406-11.
58. Lee, F.Y., et al., *Benefit of combined therapy with nicorandil and colchicine in preventing monocrotaline-induced rat pulmonary arterial hypertension*. Eur J Pharm Sci, 2013. **50**(3-4): p. 372-84.
59. Shah, B., et al., *Effect of Colchicine on Platelet-Platelet and Platelet-Leukocyte Interactions: a Pilot Study in Healthy Subjects*. Inflammation, 2016. **39**(1): p. 182-189.
60. Kovacs, P. and G. Csaba, *Effect of drugs affecting microtubular assembly on microtubules, phospholipid synthesis and physiological indices (signalling, growth, motility and phagocytosis) in Tetrahymena pyriformis*. Cell Biochem Funct, 2006. **24**(5): p. 419-29.
61. Atta, H.M., et al., *Colchicine inhibits intimal hyperplasia and leukocyte VEGF expression in dogs*. J Surg Res, 2008. **146**(2): p. 184-9.
62. Wojcicki, J., et al., *The effect of colchicine on the development of experimental atherosclerosis in rabbits*. Pol J Pharmacol Pharm, 1986. **38**(4): p. 343-8.

63. N. Merlet, F.R., E. Rheaume, Y. Shi, T. MihalacheAvram, D. Rivas, M. Mecteau, G. Brand, D. Busseuil, J.C. Tardif, *Colchicine reduces plaque inflammation and fibrosis and prevents vascular remodelling in atherosclerotic rabbits*. Congress of European Society of Cardiology, 2015.
64. Terkeltaub, R.A., et al., *High versus low dosing of oral colchicine for early acute gout flare: Twenty-four-hour outcome of the first multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-comparison colchicine study*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(4): p. 1060-8.
65. Toth, L., L. Muszbek, and I. Komaromi, *Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as predicted by QM/MM calculations*. J Mol Graph Model, 2013. **40**: p. 99-109.
66. Warner, T.D., S. Nylander, and C. Whatling, *Anti-platelet therapy: cyclooxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy*. Br J Clin Pharmacol, 2011. **72**(4): p. 619-33.
67. Morris, T., et al., *Effects of low-dose aspirin on acute inflammatory responses in humans*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2089-96.
68. Cyrus, T., et al., *Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(10): p. 1282-7.
69. Noels, H. and C. Weber, *Fractalkine as an important target of aspirin in the prevention of atherogenesis : Editorial to: "Aspirin inhibits fractalkine expression in atherosclerotic plaques and reduces atherosclerosis in ApoE gene knockout mice" by H. Liu et al*. Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(1): p. 1-3.
70. Herova, M., et al., *Low dose aspirin is associated with plasma chemerin levels and may reduce adipose tissue inflammation*. Atherosclerosis, 2014. **235**(2): p. 256-62.
71. Kharbanda, R.K., et al., *Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin*. Circulation, 2002. **105**(22): p. 2600-4.
72. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 973-9.

73. Chow, B.J., et al., *Prognostic and therapeutic implications of statin and aspirin therapy in individuals with nonobstructive coronary artery disease: results from the CONFIRM (COronary CT Angiography EvaluationN For Clinical Outcomes: An InteRnational Multicenter registry) registry*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(4): p. 981-9.
74. Belch, J., et al., *The prevention of progression of arterial disease and diabetes (POPADAD) trial: factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease*. BMJ, 2008. **337**: p. a1840.
75. Kim, A.J., et al., *Low-dose aspirin for prevention of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104179.
76. Ray, K.K. and C.P. Cannon, *The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(8): p. 1425-33.
77. Waehre, T., et al., *Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors*. Circulation, 2004. **109**(16): p. 1966-72.
78. Liu, Y., et al., *Effects of fluvastatin therapy on serum interleukin-18 and interleukin-10 levels in patients with acute coronary syndrome*. Acta Cardiol, 2010. **65**(3): p. 285-9.
79. Chu, A.Y., et al., *Pharmacogenetic determinants of statin-induced reductions in C-reactive protein*. Circ Cardiovasc Genet, 2012. **5**(1): p. 58-65.
80. Ridker, P.M., et al., *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. N Engl J Med, 2001. **344**(26): p. 1959-65.
81. Ridker, P.M., et al., *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2195-207.
82. Brown, P.M., A.G. Pratt, and J.D. Isaacs, *Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(12): p. 731-742.
83. van Breukelen-van der Stoep, D.F., et al., *Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: how to lower the risk?* Atherosclerosis, 2013. **231**(1): p. 163-72.

84. Ridker, P.M., *Testing the inflammatory hypothesis of atherothrombosis: scientific rationale for the cardiovascular inflammation reduction trial (CIRT)*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 332-9.
85. Silverman, H.S. and M.P. Pfeifer, *Relation between use of anti-inflammatory agents and left ventricular free wall rupture during acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1987. **59**(4): p. 363-4.
86. Giugliano, G.R., et al., *Meta-analysis of corticosteroid treatment in acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2003. **91**(9): p. 1055-9.
87. Avina-Zubieta, J.A., et al., *Immediate and past cumulative effects of oral glucocorticoids on the risk of acute myocardial infarction in rheumatoid arthritis: a population-based study*. Rheumatology (Oxford), 2013. **52**(1): p. 68-75.
88. Cheetham, T.C., et al., *Myocardial Infarction and Its Association with the Use of Nonselective NSAIDs: A Nested Case-Control and Time-to-Event Analysis*. Perm J, 2008. **12**(1): p. 16-22.
89. Graff, J., et al., *Effects of selective COX-2 inhibition on prostanoids and platelet physiology in young healthy volunteers*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(12): p. 2376-85.
90. Tam, L.S., et al., *The effects of golimumab on subclinical atherosclerosis and arterial stiffness in ankylosing spondylitis-a randomized, placebo-controlled pilot trial*. Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(6): p. 1065-74.
91. Rios-Navarro, C., et al., *Differential effects of anti-TNF-alpha and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions*. Eur J Pharmacol, 2015. **765**: p. 355-65.
92. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 618-23.
93. Libby, P., S.J. Warner, and G.B. Friedman, *Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids*. J Clin Invest, 1988. **81**(2): p. 487-98.
94. Abderrazak, A., et al., *Anti-inflammatory and antiatherogenic effects of the NLRP3 inflammasome inhibitor arglabin in ApoE2.Ki mice fed a high-fat diet*. Circulation, 2015. **131**(12): p. 1061-70.

95. Ridker, P.M., et al., *Effects of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial*. *Circulation*, 2012. **126**(23): p. 2739-48.
96. Ridker, P.M., et al., *Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)*. *Am Heart J*, 2011. **162**(4): p. 597-605.
97. Novartis, *Novartis Phase III study shows ACZ885 (canakinumab) reduces cardiovascular risk in people who survived a heart attack*.
98. Verma, S., et al., *Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein*. *Circulation*, 2002. **105**(16): p. 1890-6.
99. Kleveland, O., et al., *Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(30): p. 2406-13.
100. Tzellos, T., A. Kyrgidis, and C.C. Zouboulis, *Re-evaluation of the risk for major adverse cardiovascular events in patients treated with anti-IL-12/23 biological agents for chronic plaque psoriasis: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2013. **27**(5): p. 622-7.
101. Erbel, C., et al., *Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 8167-75.
102. Stahli, B.E., et al., *Effects of the P-Selectin Antagonist Inclacumab on Myocardial Damage After Percutaneous Coronary Intervention According to Timing of Infusion: Insights From the SELECT-ACS Trial*. *J Am Heart Assoc*, 2016. **5**(11).
103. Stahli, B.E., et al., *Effects of P-Selectin Antagonist Inclacumab in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery: SELECT-CABG Trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2016. **67**(3): p. 344-6.
104. Kritchevsky, D., *Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history*. *J Nutr*, 1995. **125**(3 Suppl): p. 589S-593S.

105. Dornas, W.C., et al., *Experimental atherosclerosis in rabbits*. Arq Bras Cardiol, 2010. **95**(2): p. 272-8.
106. Hayashi, T., et al., *Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(23): p. 11259-63.
107. Spagnoli, L.G., et al., *Aging and atherosclerosis in the rabbit. 1. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis, 1991. **89**(1): p. 11-24.
108. Johnstone, M.T., et al., *In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(9): p. 1556-60.
109. Kolodgie, F.D., et al., *Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(12): p. 1454-64.
110. Abela, G.S., et al., *Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model*. Circulation, 1995. **91**(3): p. 776-84.
111. El Aidi, H., et al., *Cross-sectional, prospective study of MRI reproducibility in the assessment of plaque burden of the carotid arteries and aorta*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2009. **6**(3): p. 219-28.
112. Fleg, J.L., et al., *Detection of high-risk atherosclerotic plaque: report of the NHLBI Working Group on current status and future directions*. JACC Cardiovasc Imaging, 2012. **5**(9): p. 941-55.
113. Millon, A., et al., *Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression*. Vascular, 2014. **22**(3): p. 221-37.
114. Corti, R., et al., *Fenofibrate induces plaque regression in hypercholesterolemic atherosclerotic rabbits: in vivo demonstration by high-resolution MRI*. Atherosclerosis, 2007. **190**(1): p. 106-13.
115. Tawakol, A., et al., *In vivo 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(9): p. 1818-24.

116. Kim, H.J., et al., *Carotid inflammation on (1)(8)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography associates with recurrent ischemic lesions*. J Neurol Sci, 2014. **347**(1-2): p. 242-5.
117. Rudd, J.H., et al., *Atherosclerosis inflammation imaging with 18F-FDG PET: carotid, iliac, and femoral uptake reproducibility, quantification methods, and recommendations*. J Nucl Med, 2008. **49**(6): p. 871-8.
118. Hyafil, F., et al., *Quantification of inflammation within rabbit atherosclerotic plaques using the macrophage-specific CT contrast agent N1177: a comparison with 18F-FDG PET/CT and histology*. J Nucl Med, 2009. **50**(6): p. 959-65.
119. Zhao, Q.M., et al., *Imaging of atherosclerotic aorta of rabbit model by detection of plaque inflammation with fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography*. Chin Med J (Engl), 2011. **124**(6): p. 911-7.
120. Greenland, P., et al., *ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) developed in collaboration with the Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention and the Society of Cardiovascular Computed Tomography*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(3): p. 378-402.
121. Budoff, M.J., et al., *Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(18): p. 1860-70.
122. Tinana, A., G.S. Mintz, and N.J. Weissman, *Volumetric intravascular ultrasound quantification of the amount of atherosclerosis and calcium in nonstenotic arterial segments*. Am J Cardiol, 2002. **89**(6): p. 757-60.
123. Puri, R., et al., *Impact of statins on serial coronary calcification during atheroma progression and regression*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(13): p. 1273-82.

124. Massy, Z.A., et al., *Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(1): p. 109-16.
125. Viles-Gonzalez, J.F., et al., *In vivo 16-slice, multidetector-row computed tomography for the assessment of experimental atherosclerosis: comparison with magnetic resonance imaging and histopathology*. Circulation, 2004. **110**(11): p. 1467-72.
126. Salem, M.K., et al., *Identification of patients with a histologically unstable carotid plaque using ultrasonic plaque image analysis*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2014. **48**(2): p. 118-25.
127. Inaba, Y., J.A. Chen, and S.R. Bergmann, *Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis*. Atherosclerosis, 2012. **220**(1): p. 128-33.
128. Lopez-Melgar, B., et al., *Accurate quantification of atherosclerotic plaque volume by 3D vascular ultrasound using the volumetric linear array method*. Atherosclerosis, 2016. **248**: p. 230-7.
129. Li, Y., et al., *The therapeutic effect of bevacizumab on plaque neovascularization in a rabbit model of atherosclerosis during contrast-enhanced ultrasonography*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30417.
130. Matthews, S.D. and W.H. Frishman, *A Review of the Clinical Utility of Intravascular Ultrasound and Optical Coherence Tomography in the Assessment and Treatment of Coronary Artery Disease*. Cardiol Rev, 2017. **25**(2): p. 68-76.
131. Kawasaki, M., et al., *Diagnostic accuracy of optical coherence tomography and integrated backscatter intravascular ultrasound images for tissue characterization of human coronary plaques*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(1): p. 81-8.
132. Kume, T., et al., *Assessment of coronary intima--media thickness by optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound*. Circ J, 2005. **69**(8): p. 903-7.
133. Jang, I.K., et al., *Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 604-9.

134. Lin, Q.F., et al., *Atherosclerotic plaque identification by virtual histology intravascular ultrasound in a rabbit abdominal aorta model of vulnerable plaque*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. **238**(11): p. 1223-32.
135. Puri, R., M.I. Worthley, and S.J. Nicholls, *Intravascular imaging of vulnerable coronary plaque: current and future concepts*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(3): p. 131-9.
136. Wang, T., et al., *Combined two-photon luminescence microscopy and OCT for macrophage detection in the hypercholesterolemic rabbit aorta using plasmonic gold nanorose*. Lasers Surg Med, 2012. **44**(1): p. 49-59.
137. Fulcher, J., et al., *Optical coherence tomography for serial in vivo imaging of aortic plaque in the rabbit: a preliminary experience*. Open Heart, 2015. **2**(1): p. e000314.
138. Phinikaridou, A., et al., *A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis*. J Lipid Res, 2009. **50**(5): p. 787-97.
139. Brooks, P.M., D. Burton, and M.J. Forrest, *Crystal-induced inflammation in the rat subcutaneous air-pouch*. Br J Pharmacol, 1987. **90**(2): p. 413-9.
140. Maduri, S. and V.R. Atla, *Formulation of colchicine ointment for the treatment of acute gout*. Singapore Med J, 2012. **53**(11): p. 750-4.
141. Marcovici, I., et al., *Colchicine and post-inflammatory adhesions in a rabbit model: a dose-response study*. Obstet Gynecol, 1993. **82**(2): p. 216-8.
142. Phinikaridou, A., et al., *In vivo detection of vulnerable atherosclerotic plaque by MRI in a rabbit model*. Circ Cardiovasc Imaging, 2010. **3**(3): p. 323-32.
143. Shimizu, T., et al., *Simple rabbit model of vulnerable atherosclerotic plaque*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2009. **49**(8): p. 327-32; discussion 332.
144. Yla-Herttuala, S., et al., *Stabilization of atherosclerotic plaques: an update*. Eur Heart J, 2013. **34**(42): p. 3251-8.
145. Stone, G.W., et al., *A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis*. N Engl J Med, 2011. **364**(3): p. 226-35.
146. Tian, J., et al., *Distinct morphological features of ruptured culprit plaque for acute coronary events compared to those with silent rupture and thin-cap fibroatheroma: a combined optical coherence tomography and intravascular ultrasound study*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(21): p. 2209-16.

147. Arbab-Zadeh, A. and V. Fuster, *The myth of the "vulnerable plaque": transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(8): p. 846-55.
148. Kubo, T., et al., *The dynamic nature of coronary artery lesion morphology assessed by serial virtual histology intravascular ultrasound tissue characterization*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(15): p. 1590-7.
149. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I*. Circulation, 2003. **108**(14): p. 1664-72.
150. Kantor, B., et al., *Coronary computed tomography and magnetic resonance imaging*. Curr Probl Cardiol, 2009. **34**(4): p. 145-217.
151. Ioannidis, J.P. and I. Tzoulaki, *What makes a good predictor?: the evidence applied to coronary artery calcium score*. JAMA, 2010. **303**(16): p. 1646-7.
152. Tawakol, A., et al., *Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography*. J Nucl Cardiol, 2005. **12**(3): p. 294-301.
153. Vucic, E., et al., *Pioglitazone modulates vascular inflammation in atherosclerotic rabbits noninvasive assessment with FDG-PET-CT and dynamic contrast-enhanced MR imaging*. JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(10): p. 1100-9.
154. Yabushita, H., et al., *Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography*. Circulation, 2002. **106**(13): p. 1640-5.
155. Rodriguez-Granillo, G.A., et al., *[New insights towards catheter-based identification of vulnerable plaque]*. Rev Esp Cardiol, 2005. **58**(10): p. 1197-206.
156. Tall, A.R. and L. Yvan-Charvet, *Cholesterol, inflammation and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 104-16.
157. Grebe, A. and E. Latz, *Cholesterol crystals and inflammation*. Curr Rheumatol Rep, 2013. **15**(3): p. 313.
158. Abela, G.S., et al., *Effect of statins on cholesterol crystallization and atherosclerotic plaque stabilization*. Am J Cardiol, 2011. **107**(12): p. 1710-7.